



Universidad
Politécnica
de Cartagena

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

Departamento de Ingeniería de los
Alimentos y del Equipamiento Agrícola

***CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL FRUTO
ASOCIADA AL CARÁCTER CLIMATÉRICO EN
LÍNEAS CASI-ISOGÉNICAS DE MELÓN***

Noelia Dos Santos Carrillo

2014



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

Departamento de Ingeniería de los
Alimentos y del Equipamiento Agrícola

CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL FRUTO ASOCIADA AL CARÁCTER CLIMATÉRICO EN LÍNEAS CASI-ISOGÉNICAS DE MELÓN

Noelia Dos Santos Carrillo

Directores

**Juan Pablo Fernández Trujillo
Antonio José Monforte Gilabert**

2014



Universidad
Politécnica
de Cartagena

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CARTAGENA

Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica

Departamento de Ingeniería de los
Alimentos y del Equipamiento Agrícola

CARACTERIZACIÓN DE LA CALIDAD DEL FRUTO ASOCIADA AL CARÁCTER CLIMATÉRICO EN LÍNEAS CASI-ISOGÉNICAS DE MELÓN

Trabajo presentado por **NOELIA DOS SANTOS CARRILLO**

Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos, para aspirar al Grado
de Doctora por la Universidad Politécnica de Cartagena.

DIRIGIDA por

PROF. DR. ING. JUAN PABLO FERNÁNDEZ TRUJILLO

PROF. DR. ING. ANTONIO JOSÉ MONFORTE GILABERT

2014

CARTAGENA, MURCIA, ESPAÑA



**CONFORMIDAD DE SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE DEPÓSITO DE
TESIS DOCTORAL POR EL/LA DIRECTOR/A DE LA TESIS**

D. Juan Pablo Fernández Trujillo y D. Antonio José Monforte Gilabert Directores de
la Tesis doctoral *“Caracterización de la Calidad del Fruto Asociada al Carácter Climatérico en
Líneas Casi-Isogénicas de Melón”*

INFORMA:

Que la referida Tesis Doctoral, ha sido realizada por D^a. **Noelia Dos Santos Carrillo**,
dentro del programa de doctorado **Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo
Agrario y Alimentario** dando mi conformidad para que sea presentada ante la Comisión
de Doctorado para ser autorizado su depósito.

La rama de conocimiento en la que esta tesis ha sido desarrollada es:

☒ Ciencias

☐ Ciencias Sociales y Jurídicas

☐ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, a 22 de enero de 2014

LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo.: Juan Pablo Fernández Trujillo

Fdo.: Antonio José Monforte Gilabert

COMISIÓN DE DOCTORADO



**CONFORMIDAD DE DEPÓSITO DE TESIS DOCTORAL
POR LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA**

D **Francisco Artés Hernández**, Presidente/a de la Comisión Académica del Programa
Técnicas Avanzadas en Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario

INFORMA:

Que la Tesis Doctoral titulada, "*Caracterización de la Calidad del Fruto Asociada al Carácter Climatérico en Líneas Casi-Isogénicas de Melón*", ha sido realizada, dentro del mencionado programa de doctorado, por D^a **Noelia Dos Santos Carrillo**

bajo la dirección y supervisión de los Drs. **Juan Pablo Fernández Trujillo** y **Antonio José Monforte Gilabert**

En reunión de la Comisión Académica de fecha 19/1/14, visto que en la misma se acreditan los indicios de calidad correspondientes y la autorización del Director de la misma, se acordó dar la conformidad, con la finalidad de que sea autorizado su depósito por la Comisión de Doctorado.

La Rama de conocimiento por la que esta tesis ha sido desarrollada es:

☒ Ciencias

☐ Ciencias Sociales y Jurídicas

☐ Ingeniería y Arquitectura

En Cartagena, 23 de Enero de 2014

EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA

Fdo: Francisco Artés Hernández

COMISIÓN DE DOCTORADO

*A los puntales de mi vida,
mis padres, Fran e Isabel, y
mi hermana, Soraya, sin
duda la mejor parte de mí.
Sin vosotros no soy nadie.*

*A mi familia, amigos, y a
mis niñas Akira, Misika y
Kai*

Caminante no hay Camino, se hace Camino al Andar, ilustrativos versos de Machado para concluir este larga etapa de mi camino.

No podría dar por finalizado este hito de mi trayecto personal y profesional sin dar las GRACIAS a las numerosas instituciones que con su apoyo económico me han brindado la posibilidad de desarrollar de mi carrera profesional en el ámbito de la investigación científica, pero sobre todo y especialmente he de agradecer a las numerosas y valiosas personas y profesionales que se han ido cruzando en mi recorrido estos últimos años, aportándome además de su conocimiento, valía y energía, en algunos casos su insustituible amistad. No existen metas alcanzadas o dificultades superadas si no son compartidas con los que te quieren y apoyan, y siempre agradeciendo en su justa medida a los que a veces y aun sin saberlo fueron un oasis en mi particular desierto.

GRACIAS a mis amigos, algunos de ellos también compañeros investigadores, por aportarme las cosas buenas de la vida. Gracias a Elisa por su capacidad de trabajo y su sonrisa. Gracias a Juan Pablo por su templanza y tranquilidad. Gracias a ambos por quererme como soy y compartir conmigo el día a día. Gracias a María por su energía y su alegría. Gracias a Ginés por su saber estar y su elegancia. Gracias a Natalia B. por su fuerza y seguridad. Gracias a Stelian por su inteligencia y su capacidad de liderazgo. Gracias a Elena por su entrega a los demás. Gracia a María José por saber escuchar y aconsejar. Gracias a Nino por su pasión y por saber quién soy. Gracias a Carmen Elisa por su belleza interior. Gracias Laura por su bondad. Gracias a Mercedes por su lucha. Gracias a Karmen por su originalidad. Gracias a Inés por sus locuras. Gracias a Pepe por su generosidad. Gracias Fernanda, Natalia F., Sonia, Gaby, Mariano, Sema, Javi...y algunos que quedarán en el tintero. Gracias a todos por ser y por estar.

GRACIAS al *Dr. Juan Pablo Fernández-Trujillo* por su dirección, sus conocimientos, su tiempo y su valía profesional y mostrarme lo que es la devoción a la investigación.

GRACIAS al *Dr. Antonio José Monforte Gilabert* por la codirección de la tesis y sus aportes científicos en genética tan necesarios para el desarrollo de la misma.

GRACIAS al **Dr. Javier Mauricio Obando-Ulloa** por su amistad y compartir conmigo sus conocimientos reafirmandome en el valor de la constancia y la perseverancia.

GRACIAS a todo el “**Grupo de Poscosecha y Refrigeración**” (**GPR**) de la Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT) y su director el Dr. Francisco Artés Calero por el apoyo científico y personal durante el desarrollo de mi tesis doctoral. Gracias a Victor, Javier, Ana C, Stephanie, Mariano, Pedro, Alejandro, Natalia, Javi, Ginés, Encarni, Marta Patricia, Perla, Paco, por los momentos compartidos.

GRACIAS al **Dr. Juan Antonio Martínez López** por su ayuda y su conocimiento compartido durante estos años.

GRACIAS a la **Dra. María del Carmen Bueso Sánchez** por mostrarme parte de sus conocimientos de estadística, por las horas compartidas y dedicadas, y especialmente por su apoyo y valía personal, sin los cuales la llegada a meta de este largo viaje no hubiera sido posible.

GRACIAS a todos los que han colaborando en las agotadoras e interminables campañas de melón haciéndolas más llevaderas. Gracias a Claudia, Yineth, Paola, Pablo, Kos, Mercedes, María José, Madhi, Abimael y Fidencio. Gracias también a los alumnos Isabel, Pauline, Anais, Inés, Brendan, Melanie, Gäell, Citlalli, y Marisela por su trabajo.

GRACIAS al Grupo de “**Pared Celular y Componentes Bioactivos**” del Departamento de Biotecnología de los Alimentos del Instituto de la Grasa (CSIC) de Sevilla. Especialmente a las Dras. Rocío Rodríguez Arcos y Ana José Jiménez Araujo, que llevaron mis diversas investigaciones en dicho centro y fueron un gran apoyo personal. Gracias a Rafael, Guillermo, José María, Antonio Lama, Fátima y Javier por vuestra ayuda, vuestro cariño y esos desayunos inolvidables. Gracias a Eduardo, Javier Casado, Eva, Concha, Paco, Antonio, Víctor por los momentos y risas compartidos. Gracias a mi amiga Sara por ser y estar en buenos y malos momentos y hacer que mi vida en Sevilla fuera aun mejor. Gracias a Sevilla y sus rincones especiales por acogerme y hacerme disfrutar y crecer como persona.

GRACIAS al “**Trace Gas Research Group**” del laboratorio Life Science Trace Gas Facility. Molecular and Laser Physics. Institute of Molecules and Material de la Radboud University Nijmegen de Holanda. Agradecer de manera especial a la Dra.

Simona Cristescu su valioso aporte como investigadora y su apoyo durante mi estancia en su laboratorio. Gracias a los técnicos Alexandar y Harren que siempre me brindaron su ayuda con una gran sonrisa. Gracias sobre todo a Elena Crespo por hacer mi estancia en Nijmegen mucho mejor.

GRACIAS al “*Departamento de Genética Vegetal*” del Institut de Recerca y Technologies Agroalimentàries (IRTA)” de Barcelona (Cabrils). Agradecer sobre todo a la Dra. Montse Saladié los conocimientos compartidos y la ayuda prestada en el tanto desarrollo de mi trabajo como en el ámbito personal. Gracias a Ángel Montejo por la asistencia técnica y sobre todo por su amistad y compartir conmigo su afición al remo nocturno.

GRACIAS al “*Servicio de Apoyo Tecnológico*” (SAIT) de la UPCT. Agradecer muy especialmente a la Dr. María José Roca sus aportaciones técnicas y científicas y su gran profesionalidad. Gracias Ana Vanesa, Ana Belén, y Cristina por su trabajo.

GRACIAS al *Ministerio de Educación de España (MEC)*, a la *Fundación Séneca de la Región de Murcia* y a la *Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT)* por las becas y contratos. GRACIAS al *Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) o actual Ministerio de Economía de Competitividad, Consejería de Educación y Cultura de la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia (CARM), Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), Unión Europea (UE)* por los proyectos y estancias financiados. Gracias a la empresas *AB-BIOTICS S.L* y *NUNHEMS* por los contratos en que he participado.

GRACIAS a *Semillas Fitó* que suministro de semillas de ‘Piel de Sapo’, *al IRTA* por las semillas de las NILs, y a *Plácido Varó* y su equipo (Antonio Gutiérrez, María José García, Ricardo Gálvez, etc.) del *Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA)* en Torre Pacheco (Consejería de Agricultura de la Región de Murcia) por el manejo del cultivo en las diferentes campañas de cosecha y por todas las facilidades y extraordinaria y amistosa acogida que siempre nos han brindado.

GRACIAS a mis padres *Fran e Isabel* por la educación que me han dado, por los valores que me han inculcado y por ser firmes bastiones en mi vida. GRACIAS A mi hermana *Soraya* por aguantarme y apoyarme.

GRACIAS a *mis abuelos* que aunque ausentes siempre estarán presentes en mis pensamientos. A toda mi *familia*, especialmente a mis tíos, *Pepe y Nati*, y a mis primos *Javi, Jose y Virginia*, GRACIAS por quererme y por ser como sois.

RESUMEN

El fruto del melón (*Cucumis melo* L.) es muy apreciado por los consumidores por su sabor dulce y aroma agradable y su cultivo es de gran importancia en España y en particular en la Región de Murcia. *C. melo* L. se caracteriza por su gran diversidad genética y de comportamiento fisiológico lo que lo convierte en un modelo ideal para el estudio del metabolismo y la maduración en frutos carnosos. El objetivo de esta tesis doctoral fue identificar los *Quantitative Trait Loci* (QTLs) asociados a parámetros de calidad del melón y caracterizar algunos de sus efectos, especialmente relacionados a la producción de compuestos volátiles aromáticos y textura del fruto del melón. También se estableció la relación entre el comportamiento fisiológico de los frutos y algunas de sus características. Se utilizaron líneas casi-isogénicas o NILs de melón con distinto comportamiento fisiológico y obtenidas del cruzamiento entres dos parentales no climatéricos, el cultivar español ‘Piel de Sapo’ (PS) tipo inodorus y la accesión exótica coreana tipo conomon PI 161375 ‘Shongwan Charmi’ (SC). Las NILs contenían una introgresión homocigótica casi única del parental SC en el fondo genético del parental PS. Los análisis realizados en los frutos de melón han permitido comparar las NILs con respecto del parental PS y así detectar diferencias mediante diversas técnicas estadísticas univariante y multivariantes con el fin de poder identificar QTLs de interés en el mapa genético del melón y localizar aromas discriminantes. El comportamiento climatérico de la NIL 6M1 y del cultivar ‘Védrantais’ (leve y moderado, respectivamente) estuvo asociado a una mayor producción de ésteres (acetato y no acetato) y compuestos derivados del azufre, mostrando una dependencia al menos parcial del etileno para su síntesis. Aldehídos, alcoholes y cetonas estuvieron asociados al comportamiento no climatérico del control PS, cultivar ‘Nicolás’ y de las NILs SC10- 2 y SC7-1, mostrado su carácter etileno-independiente. Se han identificado QTLs asociados a la firmeza de la pulpa y la producción aromas volátiles en NILs de melón con introgresiones en los grupos de ligamiento III/VI (comportamiento climatérico) o VII y X (comportamiento no climatérico). Un QTL (*ff7.2*) fue mapeado en el LG VII asociado a la mayor firmeza de la pulpa de la NIL SC7-1 y relacionada con el mayor contenido en componentes estructurales de la pared celular como galactosa y residuo de α -celulosa. Otro QTL relacionado a una mayor degradación de pectinas fue asociado a los QTLs del

climaterio de la NIL SC3-5-1, mientras que otro QTL relacionado con la introgresión que produce el climaterio (localizada en el LG III) estuvo asociado a la producción de ésteres. Otros treinta y dos QTLs; doce identificados en el LG VII y veinte en el LG X fueron asociados a la producción de ciertos aromas volátiles sirviendo como potenciales biomarcadores de mayor firmeza de la pulpa (especialmente aldehídos producidos vía aminoacídica) y otras diferencias texturales (especialmente relacionadas con la síntesis compuestos derivados del azufre y compuestos derivados de la metionina) entre NILs de melón no climatéricas. Las NILs de melón con distinto comportamiento fisiológico han resultado de alto interés para dilucidar el carácter etileno-dependiente, etileno-independiente o solo parcialmente etileno dependiente de aromas volátiles y textura, así como la interrelación entre dos de los parámetros más importantes que definen la características de este fruto y por ende a ampliar el conocimiento acerca del etileno y sus efectos sobre la calidad global y parcial de la fruta en general y del melón en particular.

Palabras clave: α -celulosa, ácidos urónicos, alcoholes, aldehídos, aminoácidos, análisis de componentes principales, análisis de mínimos cuadrados parciales, análisis multivariante, análisis de múltiples árboles de decisión o *random forest*, análisis univariante, azúcares neutros, calidad del fruto, celulosa, cetonas, climatérico, comportamiento fisiológico, compuestos aromáticos volátiles, compuestos derivados del azufre, *Cucumis melo* L., ésteres acetato, ésteres no acetato, etileno, firmeza de la pulpa, genotipo, grupo de ligamiento, hemicelulosa, líneas de introgresión, líneas casi-isogénicas, maduración del fruto, marcadores moleculares, no climatérico, pared celular, precursores aromáticos, ‘Piel de Sapo’, Quantitative Trait Loci, rutas metabólicas, ‘Shongwan Charmi’, textura, xiloglucanos.

ABSTRACT

Melon fruit (*Cucumis melo* L.) is highly appreciated by consumers for its sweet taste and pleasant aroma, being a crop of great importance in Spain and particularly in the Region of Murcia *C. melo* L. is characterized by its great genetic diversity and physiological behavior which makes it a ideal model for the study of metabolism and ripening in fleshy fruits. The aim of this thesis was identify *Quantitative Trait Loci* (QTLs) associated with melon quality parameters and characterize some of its effects, especially associated with the production of aromatic volatile compounds and texture of melon fruit. The relationship between the physiological behavior of the fruit and some of its characteristics is also established. Near-isogenic lines or NILs of melon with different physiological behavior and obtained by crossing of two non-climacteric parents, the Spanish cultivar inodorus type ‘Piel de Sapo’ (PS) and the Korean exotic accession PI 161375 conomon type ‘Shongwan Charmi’ (SC) were used. The NILs contained a homozygous introgression almost unique of parental SC in the genetic background of parental PS. The analyses realized in melon fruits has allowed comparing the NILs with the parental PS and so detect differences by means of several univariate and multivariate statistical techniques in order to identify QTLs of interest in the melon genetic map and locate discriminant aromas. The climacteric behavior of NIL 6M1 and cultivar ‘Védrantais’ (slight and moderate, respectively) was associated with increased production of esters (acetate and no acetate) and sulfur-derived compounds, showing at least a partial ethylene dependence for their synthesis. Aldehydes, alcohols and ketones were associated with non-climacteric behavior of the control PS, cultivar ‘Nicolas’ and NILs SC10-2 and SC7-1, shown its ethylene-independent character.

QTLs associated with flesh firmness and aroma volatile production in melon NILs with introgressions in the linkage groups III/VI (climacteric behavior) or VII and X (non-climacteric behavior) had been identified. A QTL (*ff7.2*) located in the LG VII associated with higher flesh firmness in NIL SC7-1 was mapped and related to the higher content of cell wall structural components, as galactose and α -cellulose residue. Another QTL associated with increased pectin degradation was associated to climacteric QTLs of the NIL SC3-5-1, whereas another QTL related to introgresión which produce climacteric (located in LG III) was associated to esters production. Other thirty-two QTLs, twelve identified in the LG VII and twenty in the LG X were associated to the

production of certain volatile aromas serving as potential biomarkers of higher flesh firmness (especially aldehydes produced via aminoacid) and other textural differences (especially related to synthesis of sulfur-derived compounds and compounds obtained via methionine) between non climacteric melon NILs. Melon NILs with different physiological behavior have been results of great interest to elucidate the ethylene-dependent, ethylene-independent or only partially ethylene-dependent character of aroma volatiles and texture, as well as the interrelation among two of the most important parameters that define the characteristics of this fruit, and therefore to increase the knowledge about the ethylene and its effects on global and partial fruit quality in general and melon in particular.

Keywords: α -cellulose, acetate esters, alcohols, aldehydes, aminoacids, aroma precursors, aromatic volatile compounds, cell wall, climacteric, *Cucumis melo* L., ethylene, flesh firmness, fruit quality, fruit ripening, genotype, hemicellulose, introgression lines, ketones, linkage group, metabolic pathways, molecular markers, multivariate analysis, near-isogenic lines, neutral sugars, non acetate esters, non climacteric, partial least squares analysis, physiological behavior, ‘Piel de Sapo’, principal component analysis, Quantitative Trait Loci, random forest analysis, ‘Shongwan Charmi’, sulfur-derived compounds, texture, univariate analysis, uronic acids, xyloglucans.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	XI -XVI
RESUMEN	XVII-XVIII
ABSTRACT	XIX-XX
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	XXIX-XXXII
ABBREVIATIONS AND ACRONYMS.....	XXXIII-XXXVI
PUBLICACIONES.....	XXXVII-XLIV
Publicaciones presentadas en la Tesis Doctoral	XXXVII
Otras publicaciones relacionadas con la Tesis Doctoral.....	XXXVIII-XLIII
OBJETIVOS	XLV-XLVI
Objetivo general.....	XLV
Objetivos específicos	XLV-XLVI

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1-40
1.1 Generalidades	3-24
1.1.1 El fruto del melón (<i>Cucumis melo</i> L.). Origen.	3
1.1.2 Descripción botánica.....	3-5
1.1.3 Descripción genética.....	6-7
1.1.4 Clasificación.....	7-11
1.1.5 Aspectos nutricionales	11-13
1.1.6 Importancia económica.....	13-17
1.1.7 Cultivo.....	18-20
1.1.8 Cosecha y conservación	20-24
1.2 Calidad del fruto del melón.....	24-29
1.2.1 Azúcares.....	26-28
1.2.2 Ácidos orgánicos.....	28-30

1.3 Líneas casi-isogénicas de melón.....	30-31
1.4 Marcadores moleculares y quantitative trait loci.	31-32
1.5 Etileno y tasa respiratoria.....	33-40
1.5.1 Comportamiento fisiológico. Frutos climatéricos vs. no climatéricos.....	36-40
2. COMPUESTOS VOLÁTILES.....	41-64
2.1 Compuestos volátiles. Generalidades	43-44
2.2 Síntesis de compuestos volátiles y principales enzimas implicadas.....	44-51
2.2.1 Lipoxigenasa (LOX)	47
2.2.2 Fosfolipasas.....	48
2.2.3 Hidroxiperoxido liasa (HPL)	48
2.2.4 Alcohol deshidrogenasa (ADH).....	48
2.2.5 Alcohol acil-transferasa (ATT).....	48
2.2.6 Aminoácidos como precursores de compuestos volátiles.....	48-51
2.3 Principales compuestos volátiles del melón	52-59
2.3.1 Ésteres	54-55
2.3.2 Alcoholes y aldehídos	56-57
2.3.3 Compuestos derivados del azufre	57-59
2.4 Etileno y producción de compuestos volátiles en melón	59-62
2.5 QTLs y compuestos volátiles en melón	62-63
3. PARED CELULAR.....	65-92
3.1 Pared celular vegetal. Definición	67
3.2 Componentes de la pared celular.	67-76
3.2.1 Pared celular primaria	67
3.2.2 Lámina media.....	68
3.2.3 Pectina, hemicelulosa y celulosa.....	69-75
3.2.3.1 Pectinas	69
3.2.3.1.1 Homogalacturonanos y ramnogalacturonanos	69-70
3.2.3.1.2 Arabinanos, galactanos y arabinogalactanos.....	71-72

3.2.3.2 Hemicelulosa	72-73
3.2.3.2.1 Xiloglucanos	73-74
3.2.3.2.2 Xilanas	74
3.2.3.3 Celulosa	74-75
3.2.4 Azúcares neutros	75-76
3.2.5 Ácidos urónicos.....	76
3.3 Degradación de la pared celular.....	76-78
3.4 Textura de la fruta	78-86
3.4.1 Definición de textura.....	78-79
3.4.2 Métodos de medida de textura	79
3.4.3 Atributos de textura.....	79
3.4.3.1 Dureza del fruto entero	80
3.4.3.2 Firmeza de la pulpa	80
3.4.3.3 Jugosidad de la pulpa	81
3.4.3.4 Fibrosidad de la pulpa	81
3.4.3.5 Harinosidad	81-82
3.4.4 Textura y degradación de la pared celular	82-83
3.4.5 Enzimas de degradación de la pared celular	83
3.4.5.1 Poligalacturonasas	83-84
3.4.5.2 Pectinmetilesterasas	84
3.4.5.3 Pectato liasas.....	84-85
3.4.5.4 β -galactosidasas	85
3.4.5.5 Xiloglucano endotransglicosilasas. Hidrolasas	85
3.4.5.6 Expansinas	85-86
3.4.5.7 Otras enzimas.....	86
3.5 Etileno y firmeza.....	86-88
3.6 Otros componentes que afectan a la firmeza de la fruta	88-90
3.7 QTLs y firmeza	90-91

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS.....	93-132
1. Población experimental.....	95-96
2. Condiciones climáticas	96
3. Preparación del campo y siembra	97-100
3.1 Siembra y riego.....	97-100
3.2 Tratamientos	98-100
4. Diseño experimental	100-103
5. Cosecha.....	103-104
6. Atributos de calidad no destructivos.....	104-109
6.1 Peso.....	104
6.2 Diámetro y longitud	104
6.3 Escriturado, olor, dehiscencia y apariencia comercial.....	104-105
6.4 Densidad	105
6.5 Color de la piel.....	105-106
6.6 Textura del fruto entero	106-107
6.7 Fotografía digital	107-109
7. Atributos de calidad destructivos.....	110-128
7.1 Preparación de muestras	110
7.2 Toma de muestras de pulpa	110
7.3 Toma de muestras de zumo	110-111
7.4 Toma de muestras de corteza.....	111
7.5 Parámetros morfológicos	113
7.6 Color de la pulpa y del zumo.....	113
7.7 Firmeza de la pulpa.....	113-114
7.8 Jugosidad de la pulpa.....	114
7.9 Densidad del zumo	115
7.10 Jugosidad del zumo.....	115
7.11 Materia seca	115-116
7.12 Parámetros químicos.....	116
7.12.1 pH	116

7.12.2 Sólidos solubles totales.....	117
7.12.3 Acidez titulable.....	117
7.12.4 Azúcares	117-119
7.12.5 Ácidos orgánicos	119-122
7.12.6 Compuestos volátiles	122-128
7.12.6.1 Determinación de compuestos volátiles en zumo	122-125
7.12.6.2 Determinación de compuestos volátiles en fruto entero	125-128
8. Parámetros fisiológicos.....	128-130
8.1 Tasa respiratoria y producción de etileno	128-130
9. Análisis estadístico.....	131-132

RESULTADOS

CAPÍTULO III

DIFERENCIAS AROMÁTICAS ENTRE MELONES CLIMATÉRICOS DE DOS TIPOS Y NO CLIMATÉRICOS DEL TIPO ‘PIEL DE SAPO’ ... 133-158

Resumen.....	135
1. Introducción.....	135-136
2. Material y métodos	136-139
2.1 Material vegetal	136-137
2.2 Manejo del cultivo y diseño experimental.....	137
2.3 Comportamiento fisiológico	137
2.4 Muestreo de zumo y análisis de compuestos volátiles	137-138
2.5 Análisis estadístico	138-139
3. Resultados y discusión.....	139-141
3.1 Tasa respiratoria y producción de etileno	139
3.2 Compuestos volátiles aromáticos	139-141
4. Conclusiones	141-142
Agradecimientos	142
Literatura citada	142-145

Literatura citada en tablas	145-150
Figuras y tablas	151-158

CAPÍTULO IV

CELL WALL POLYSACCHARIDES OF NEAR-ISOGENIC LINES OF MELON (*CUCUMIS MELO* L.) AND THEIR INBRED PARENTALS WHICH SHOW DIFFERENTIAL FLESH FIRMNESS OR PHYSIOLOGICAL BEHAVIOR 159-174

Abstract

1. Introduction.

2. Material and methods.

2.1 Plant material and experimental desing.

2.2 Physiological behavior evaluation.

2.3 Sampling and sample preparation for extraction of cell wall material (CWM).

2.4 Cell wall material isolation.

2.5 Extraction of polysaccharide components.

2.6 Polysaccharide analysis.

2.7 High-performance size exclusion chromatography (HPSEC). Analysis of the molecular weight (MW) of the polysaccharides.

2.8 Quality traits.

2.9 Statistical analysis.

3. Results.

3.1 Quality, physiological behavior and cell wall material of the parental lines (PS and SC).

3.2 Cell wall fractions.

3.3 Hemicellulosic fraction and parental lines.

3.3 Cellulosic fraction and parental lines.

3.4 Fruit quality traits of the climacteric NIL SC3-5-1 versus PS.

3.5 Differences between seasons.

4. Discussion.

4.1 NILs (SC3-5-1 and SC7-2).

4.2 Differences between seasons.

Associated content.

Author information.

Acknowledgment.

Abbreviations used.

References.

Supplementary figures.

CAPÍTULO V

AROMA VOLATILES AS BIOMARKERS OF TEXTURAL DIFFERENCES AT HARVEST IN NON-CLIMACTERIC NEAR-ISOGENIC LINES OF MELON 175-218

Abstract.

1. Introduction.

2. Material and methods.

2.1 Plant material.

2.2 Experimental design.

2.3 Textural traits.

2.4 Juice sampling and volatile compounds analysis.

2.5 Statistical analysis and QTL mapping.

3. Results.

3.1 Physiological behavior, textural traits and selection of aroma volatile compounds.

3.2 Univariate analysis of classes of compounds and QTL mapping.

3.3 Univariate analysis of individual aroma volatile compounds and QTL mapping.

3.4 Multivariate analysis of classes of volatile compounds.

3.5 Multivariate analysis of individual aroma volatiles.

3.6 PLS-DA of individual aroma volatiles.

3.7 RF of individual aroma volatiles.

3.8 Association among textural traits and aroma volatile compounds.

4. Discussion.

5. Conclusions.	
Acknowledgments.	
References.	
References of tables.	
Appendix A. Supplementary data	

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL	219-228
1. Comportamiento fisiológico en frutos de melón	222-223
2. Textura, fisiología y composición de la pared celular en frutos de melón ..	223-224
3. Mapeo de QTLs y caracterización del perfil de aromas del melón	224-226
4. Textura, compuestos volátiles aromáticos y su interrelación	226-227
5. Implicaciones prácticas de la tesis y potenciales aplicaciones	227-228

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES	229-232
LITERATURA CITADA EN CAPÍTULOS I, II, VI, VII.....	233-260
SOPORTE FINANCIERO	261-262
ANEXO.....	263-268
Capítulo III. Diferencias aromáticas entre melones climatéricos de dos tipos y no climatéricos del tipo ‘Piel de Sapo’	265-267

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AA	Aminoácido
AAT	Alcohol Acil-Transferasa
ACC	Ácido 1-Aminociclopropano-1-Carboxílico
ACD	Ácidos
ACO	ACC Oxidasa
ACS	ACC Sintasa
ADH	Alcohol Deshidrogenasa
AG	Ácido Graso
AHA	Alcano Hidrocarbonado Alifático
Ala	Alanina
ALC	Alcoholes
ALD	Aldehídos
AN	Azúcares Neutros
ANOVA	Análisis de la Varianza
Ara	L-Arabinosa
AU	Ácido Urónico
β-Gal	β-Galactosidasa
CAS	Chemical Abstracts Service
CDA	Compuestos Derivados del Azufre
CE	Conductividad Eléctrica
CEL	Celulosa
CET	Cetonas
CI	Cromatografía de Intercambio Iónico
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
CSF	Fracción Soluble en Carbonato
CWM	Material de Pared Celular
DHL	Línea Doble haploide
EA	Ésteres Acetato
ENA	Ésteres No Acetato
EXP	Expansina
FDR	Test de Ratio de Falsos Positivos

Fen	Fenilalanina
FF	Firmeza de la Pulpa
FJ	Jugosidad de la Pulpa
Fuc	D-Fucosa
Gal	D-Galactosa
GalA	Ácido Galacturónico
GC-MS	Cromatografía de Gases-Masas
Glc	D-Glucosa
HG	Homogalacturonanos
HPL	Hidroperóxido Liasa
IA	Invertasa Ácida
ISF	Fracción Soluble en Imidazol
Iso	Isoleucina
JD	Densidad del Zumo
JJ	Jugosidad del Zumo
K1SF	Fracción Soluble en Potasio 1 M
K2SF	Fracción Soluble en Potasio 4 M
LDA	Análisis Discriminante Lineal
Leu	Leucina
LG	Grupo de Ligamiento
LOX	Lipooxigenasa
LRI	Índice de Retención Lineal
Man	D-Manosa
MAS	Selección Asistida por Marcadores
MDS	Escalamiento Multidimensional
1-MCP	1-Metilciclopropeno
MEP	Metileritritol 4-Fosfato
Met	Metionina
MTA	Metiltioadenosina
MTL	Metanotiol
MW	Peso molecular
NID	Compuesto No Identificado
NIL	Línea Casi-Isogénica
NIST	National Institute for Standards and Technology

OTH	Otros
PCA	Análisis de Componentes Principales
PG	Poligalacturonasa
PJ	Contenido en Fibra del Zumo
PL	Pectato Liasa
PLS-DA	Análisis Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales
PME	Pectin Metilesterasa
PS	Cultivar Español ‘Piel de Sapo’
QTL	Quantitative Trait Loci
Ram	L-Ramnosa
RF	Random Forest ó árboles de decisión
RG	Ramnogalacturonano
SAM	S-Adenosilmetionina
SC	Cultivar Coreano ‘Shongwan Charmi’ Accessión PI161375
SFS	Sacarosa Fosfato Sintasa
SS	Sólidos Solubles
SST	Sólidos Solubles Totales
SPME	Micro-Extracción en Fase Sólida
TER	Terpenos
Tir	Tirosina
TR	Tiempo de Retención
UA	Ácidos Urónicos
Val	Valina
VIM	Importancia de las Variables en la Medida
VIP	Importancia de las Variables en la Proyección
WFH	Dureza del Fruto Entero
XG	Xiloglucano
Xil	D-Xilosa

ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

AA	Aminoacid
AAT	Alcohol Acyl-Transferase
ACC	1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid
ACD	Acids
ACO	ACC Oxidase
ACS	ACC Synthase
ADH	Alcohol Dehydrogenase
AE	Acetate Esters
AHA	Aliphatic Hydrocarbon Alkanes
Ala	Alanine
ALC	Alcohols
ALD	Aldehydes
ANOVA	Analysis of Variance
Ara	L-Arabinose
CAS	Chemical Abstracts Service
CE	Electric Conductivity
α -CEL	α -Cellulose Residue
CEL	Cellulose
CI	Ion Exchange Chromatography
CSF	Carbonate-Soluble Fraction
CWM	Cell Wall Material
DHL	Doubled Haploid Line
EXP	Expansin
FA	Fatty acid
FDR	False Discovery Rate Test
FF	Flesh Firmness
FJ	Flesh Juiciness
Fuc	Fucose
β -Gal	β -Galactosidase
Gal	D-Galactose
GalA	Galacturonic Acid

GC-MS	Gas-Chromatography Mass-Spectrometry
Glc	D-Glucose
HG	Homogalacturan
HPL	Hydroperoxide Lyase
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
HSSE	Headspace Sorptive Extraction
IA	Acid Invertase
ISF	Imidazole-Soluble Fraction
Iso	Isoleucine
JD	Juice Density
JJ	Juiciness
K1SF	1 M Potassium-Soluble Fraction
K2SF	4 M Potassium-Soluble Fraction
KET	Ketones
LDA	Linear Discriminant Analysis
Leu	Leucine
LG	Linkage Group
LOX	Lipoxygenase
LRI	Linear Retention Time
Man	D-Mannose
MAS	Marker-Assisted Selection
1-MCP	1- Methylcyclopropane
MDS	Multidimensional Scaling
MEP	Methyletritol 4-Phosphate
Met	Methionine
MTA	Methylthioadenosine
MTL	Metanethiol
MW	Molecular Weight
NAE	Non-Acetate Esters
NID	Unidentified Compound
NIL	Near-Isogenic Line
NIST	National Institute for Standards and Technology
NS	Neutral Sugars
OTH	Others

PCA	Principal Component Analysis
PG	Polygalacturonase
Phe	Phenylalanine
PJ	Pellet Content of the Juice
PL	Pectate Lyase
PLS-DA	Partial Least-Squares Discriminant Analysis
PME	Pectin Methylesterase
PS	Spanish cultivar ‘Piel de Sapo’
QTL	Quantitative Trait Loci
RF	Random Forest
RG	Ramnogalacturonan
Rha	L-Rhamnose
RT	Retention Time
SAM	S-Adenosylmethionine
SC	Korean cultivar ‘Shongwan Charmi’ accession PI161375
SDF	Sulfur-Derived Compounds
SFS	Sucrose Phosphate Synthase
SS	Soluble Solids
SST	Total Soluble Solids
SPME	Solid Phase Micro-Extraction
TER	Terpenes
Tyr	Tyrosine
UA	Uronic Acids
Val	Valine
VIM	Variable Importance Measures
VIP	Variable Importance in the Projection
WFH	Whole Fruit Hardness
XG	Xyloglucan
Xyl	D-Xylose

PUBLICACIONES

PUBLICACIONES PRESENTADAS EN LA TESIS DOCTORAL.

Congresos.

Capítulo 3 de la Tesis.

- **Dos-Santos, N., Bueso, M.C., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2013.** Diferencias aromáticas entre melones climatéricos de dos tipos y melones no climatéricos del tipo ‘Piel de sapo’. *VI Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT*. Cartagena, Murcia, España. Abril 2013. Comunicación escrita. n°6 pp. 49-51. ISSN 1888-8356. <http://www.ajict.upct.es/files/2013.VIJornada.Revista.pdf>.

Artículos Incluidos en Revistas SCI (primer cuartil).

Capítulos 4 y 5 de la Tesis.

- **Dos-Santos, N., Bueso M.C., Fernández-Trujillo, J.P. 2013.** Aroma volatiles biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food Research International* 54 (2): 1801-1812. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.031>
- **Dos-Santos, N., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Trujillo, J.P. 2011.** Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon (*Cucumis melo* L.) and their inbred parentals which show differential flesh firmness or physiological behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59: 7773-7784. <http://dx.doi.org/10.1021/jf201155a>

OTRAS PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS DOCTORAL.

Artículos Incluidos en Revistas Indexadas SCI.

- Fernández-Trujillo, J.P., Lester, G.E., **Dos-Santos, N.**, Martínez, J.A., Esteva, J., Jifon, J.L., Varó, P. **2013**. Pre- and Postharvest muskmelon fruit cracking: Causes and potential remedies. *HortTechnology* 23: 266-275.
- Tijskens, L.M.M., **Dos-Santos, N.**, Jowkar, M.M., Obando, J., Moreno, E., Schouten, R.E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2009**. Postharvest fruit firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. *Postharvest Biology and Technology* 51: 320-326. DOI:10.1016/j.postharvbio.2008.06.001
- Moreno, E., Obando, J., **Dos-Santos, N.**, Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García-Mas, J. **2008**. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theoretical and Applied Genetics* 116: 589-602. DOI 10.1007/s00122-007-0694-y

Artículos Incluidos en Revistas o Boletines (no Indexadas).

- Fernández-Trujillo, J.P., **Dos-Santos, N.**, Martínez-Alcaraz, R., Le Bleis, I., **2013**. Non-destructive aroma production of a climacteric near-isogenic line of melon obtained by headspace sorptive bar extraction technology. *Foods* 2: 401-404. doi10.3390/foods2030401 ISSN 2304-8158. <http://www.mdpi.com/2304-8158/2/3/401/pdf>.
- Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Bueso, M.C., Alarcón, A.L. Varó, P., **Dos-Santos, N.**, Obando-Ulloa, J.M. **2011**. Identification of quantitative trait loci using near-isogenic lines of melon. A research review covering potential applications in fruit quality. Boletín electrónico Universidad Politécnica de Cartagena. *The Technology and Knowledge Transfer e-bulletin*. Vol.2, nº4 pp.1-5. ISSN 2172-0436. <http://bulletin.upct.es/articulos/Vol2nro42011Bulletin%20UPCT%20Melon%20Fruit%20Quality.pdf>.

- Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Bueso, M.C., Alarcón, A.L., **Dos-Santos, N.**, Obando-Ulloa, J.M. **2011**. Identificación de poligenes asociados a atributos de calidad de fruto mediante líneas casi isogénicas. Investigación y potenciales aplicaciones. *Revista digital Horticultura* n°296 (Marzo) pp. 82-87.
<http://www.interempresas.net/Horticola/Articulos/49613-Identificacion-poligenes-asociados-atributos-calidad-fruto-mediante-lineas-casi-isogenicas.html>
<http://www.horticom.com/revistasonline/horticultura/rhg296/rhg296.pdf>

Congresos, Jornadas, Revistas y Eventos de Difusión Científica.

- Fernández-Trujillo, J.P., **Dos-Santos, N.**, Bueso, M.C., Esteva, J., Martínez, J.A., Monforte, J.A. **2013**. Melon fresh fruit quality from field to fork: A quality-oriented breeding and multivariate perspective. Symposium Quality of fresh produce, herbs and vegetables—from field to fork. *Quality of fresh produce, herbs and vegetables—from field to fork*. Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Varsovia, Polonia, 18-19 Septiembre 2013. Ponencia invitada. *Book of Abstracts* pp. 39-40.
- **Dos-Santos, N.**, Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. **2013**. Differential aroma volatiles in non-climacteric near-isogenic lines of melon as biomarkers of differences of flesh firmness at harvest. The First MDPI-Lincoln University International Conference on Foods. MDPI-AG. *Proceedings of the F. Bioact. Process. Qual. & Nutr.* Sciforum Electronic Conferences Series, 2013. Virtual, 10-12 Abril 2013. Comunicación escrita. www.sciforum.net.
<http://www.sciforum.net/conference/bpqn2013/paper/1174>.
- Fernández-Trujillo, J.P., Martínez-Alcaraz, R., Le Bleis, I., **Dos-Santos, N.** **2013**. Non-destructive aroma production of a climacteric near-isogenic line of melon obtained by headspace sorptive bar extraction technology. The First MDPI-Lincoln University International Conference on Foods. MDPI-AG. *Proceedings of the F. Bioact. Process. Qual. & Nutr.* Sciforum Electronic Conferences Series, 2013. Virtual, 10-12 Abril 2013. Comunicación escrita. www.sciforum.net.
<http://www.sciforum.net/conference/bpqn2013/paper/1175>.

- **Dos-Santos, N.,** Fernández-Trujillo, J.P. **2012.** Validación de un método de cálculo del volumen en fruto de melón mediante dimensiones obtenidas de análisis de imagen. V Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT. *V Jornadas de Introducción a la Investigación de la UPCT.* Cartagena, Murcia, España, Abril 2012. Comunicación escrita. nº5, pp. 54-56. ISSN 1888-8356. <http://www.ajict.upct.es/files/2012.VJornada.Revista.pdf>.
- **Dos-Santos, N. 2012.** Parágrafo de opinión en 30 años divulgando horticultura. *Revista Horticultura.* Horticultura, nova ágora, s.l. (Ed). Enero-Febrero 2012. nº300, p.14. D.L. B-25.481/99 / ISSN 1578-8881 <http://www.interempresas.net/FlipBooks/HC/>.
- García-Gutiérrez, M., **Dos-Santos, N.,** Chaparro-Torres, L.A., Fernández-Trujillo, J.P. **2011.** Optimización de un método no destructivo para determinar la evolución del aroma en postcosecha del fruto de melón entero. VI Congreso Virtual Iberoamericano de Gestión de Calidad en Laboratorios. En: Alsina, I., Martín de la Hinojosa, M.I., Hooghuis de Korver, H. (Coords.). *Actas del VI Congreso Virtual Iberoamericano de Gestión de Calidad en Laboratorios* 2011. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (Eds.). Madrid, España. Virtual, 1 Febrero-30 Mayo 2011. Comunicación escrita. pp. 101-103. NIPO: 770-11-299-3. http://www.iberolab.org/opencms/opencms/comunicaciones/Comunicaciones/documentos_comunicaciones/Requisitos_Tecnicos_0023.pdf.
- Fernández-Trujillo, J.P., Fernández-Talavera, M., Ruiz-León, M.T., Roca, M.J., **Dos-Santos, N. 2010.** Aroma volatiles during whole melon ripening in a climacteric near-isogenic line and its inbred non-climacteric parents. XXVII International Horticultural Congress. IHC 2010. Lisboa, Portugal, 22-27 Agosto 2010. Comunicación oral. *Abstract book* p. 84. http://www.actahort.org/books/934/934_127.htm. S02.032. *Acta Horticulturae* (ISHS) 934: 951-958. ISSN 0567-7572.

- Fernández-Trujillo, J.P., **Dos-Santos, N.**, Llanos, L., Chaparro-Torres, L., Obando-Ulloa, J.M., Alarcón, A.L., Martínez, J.A., Bueso, M.C., Jowkar, M.M., Hernández, M.S., Cañizares, X., Jiménez, A., Rodríguez-Arcos, R., Saladié, M., Monforte, A.J., García-Mas, J. **2010**. Applications of near-isogenic lines of melon to study and improve postharvest fruit quality. Gordon Research Conference on Postharvest Physiology. Postharvest quality and sustainability: Genomics to consumer experience. New Hampshire, EE.UU, 27 Junio-2 Julio 2010. Póster.
- **Dos-Santos, N.**, Critescu, S., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2009**. Evaluación del comportamiento fisiológico y aroma del fruto entero de melón mediante infrarrojo cercano, láser fotoacústico y espectrometría de masas por reacción de transferencia de protón. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTA 2009). *Libro de Comunicaciones*. Mediprint Ediciones, S.L. Murcia. España, 26-29 Mayo 2009. Comunicación oral. p. 60. ISBN: 978-84-933078-3-7.
- **Dos-Santos, N.**, Obando-Ulloa, J.M., García-Mas, J., Monforte A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2009**. Líneas casi isogénicas de melón aromáticas, climatéricas y con mayor contenido en ácido ascórbico que el tipo no climatérico ‘Piel de Sapo’. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTA 2009). *Libro de Comunicaciones*. Mediprint Ediciones, S.L. Murcia, España, 26-29 Mayo 2009. Póster. p. 300. ISBN: 978-84-933078-3-7.
- Tijsskens, L.M.M., Jacob, S., Schouten, R.E., Fernández-Trujillo, J.P., **Dos-Santos, N.**, Vangdal, E., Pagán, E., Pérez Pastor, A. **2008**. Water loss in horticultural products. Modelling, data analysis and theoretical considerations. Postharvest Unlimited (POSTDAM 2008). Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim ev. Bornimer Agrartechnische Berichte Heft 64. Potsdam, Berlín, Alemania, 4-7 Noviembre 2008. Comunicación oral. *Abstract book*, p. 162. *Acta Horticulturae* (ISHS) 858: 465-472. ISHS 2010. ISSN 0567-7572.

- Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Moreno, E., Martínez, J.A., **Dos-Santos, N.**, García-Mas, J., Monforte, A.J. **2008**. ¿Son siempre los melones climatéricos más susceptibles al daño por frío que los no climatéricos. IX Symposium Nacional y VI Ibérico sobre Maduración y Postcosecha. PostZaragoza2008. En: Oria, R., Val, J., Ferrer, A. (Eds.). *Avances en maduración y post-recolección de frutas y hortalizas*. Ed. Acribia, Zaragoza. Zaragoza, España, 21-26 Septiembre 2008. Comunicación oral. pp. 567-573. ISBN: 978-84-200-111-0.
- Tijskens, L.M.M., **Dos-Santos, N.**, Obando, J., Moreno, E., Schouten, R.E., García-Mas, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2008**. First attempts of linking modeling, postharvest behaviour and melon genetics. IV International Symposium on applications of modelling as an innovative technology in the agri-food chain. MODEL-IT. En: Barreiro, P., Hertog, M., Arranz, F.J. Diezma, B., Correa, E.C. (Eds.). *Proc. IVth IS on Model-IT*. Madrid, España, 9-11 Junio 2008. Comunicación oral. *Acta Horticulturae* (ISHS) 802: 401-408. ISHS 2008. ISSN 0567-7572.
- Obando-Ulloa, J.M., Jowkar, M.M., Moreno, E., Souri, M.K., Martínez, J.A., **Dos-Santos, N.**, Sanmartín, P., Bueso, M.C., Kessler, M., Alarcón, A.L., Nicolai, B., Lammertyn, J., García-Mas, J., Monforte, A., Fernández-Trujillo, J.P. **2008**. Near-isogenic lines of melon with different climacteric behavior as a tool to characterize fruit senescence traits. Cucurbitaceae. IX EUCARPIA International Meeting on Cucurbitaceae. En: Pitrat, M. (Ed.). *Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae*. Aviñón, Francia, 21-24 Mayo 2008. Comunicación oral. pp. 109-113. <http://hdl.handle.net/2174/202>.
- Eduardo, I., Obando, J., Moreno, E., Fernández-Silva, I., **Dos-Santos, N.**, Martínez, J.A., Alarcón, A., Álvarez, J.M., van der Knaap, E., Arús, P., García-Mas J., Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J. **2008**. The melon genomic library of near isogenic lines. A new tool for dissecting complex traits. Mondial Congress Molecular Mapping & Marker Assisted Selection in Plants. Viena, Austria, 3-6 Febrero 2008. Póster. *Abstract book* p. 45.

- Moreno, E., Obando, J., **Dos-Santos, N.**, Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García Mas, J. **2008**. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. Plant & Animal Genomes XVI Conference. San Diego, California, EE.UU, 12-16 Enero 2008. Comunicación oral. *Abstract book* p.16.
- Obando, J., **Dos-Santos, N.**, Eduardo, I., Moreno, E., Martínez, J.A., Alarcón, A.L., García-Mas, J., Arús, P., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2007**. Aplicación de una colección de líneas casi isogénicas de melón en fisiología vegetal. XVII Reunión Nacional de la Sociedad Española Fisiología Vegetal y X Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal. Congresos Fundación General de la Universidad de Alcalá (Eds.). Alcalá de Henares, Madrid, España, 18-21 Septiembre 2007. Comunicación oral. *Libro de resúmenes* pp. 500-501. <http://www.fv2007.fgua.es/comu/comu.cfm?pag=01&sec=2>.
- **Dos-Santos, N.**, Obando, J., Ostos, I., Melgarejo, LM., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2007**. Optimización de la extracción de ácidos orgánicos en pulpa liofilizada de melón y análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia. *IV Congreso Virtual Iberoamericano de Gestión de Calidad en Laboratorios* En: Rabasseda, J., Martín de la Hinojosa, M.I. (Coord.), Madrid. Ministerio de Cultura, Pesca y Alimentación (Eds.). *Actas IV Congreso Virtual Iberoamericano de Gestión de Calidad en Laboratorio* 2007. Virtual, 2 de mayo-30 de junio 2007. Comunicación escrita. pp. 203-211. I.S.B.N 978-84-491-0796-2. http://www.iberolab.org/opencms/export/sites/Iberolab/comunicaciones/Comunicaciones/documentos_comunicaciones/Requisitos_Tecnicos_0039.pdf. En CD. I.S.B.N 978-84-491-0812-9.
- Obando, J., Moreno, E., Eduardo, I., **Dos-Santos, N.**, Martínez, J.A., Alarcón, A.L., Arús, P., García-Mas, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. **2007**. Aplicaciones pre y postcosecha de una colección de líneas casi isogénicas de melón. XI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas. *Actas de Horticultura*. Albacete, España, 24-27 Abril 2007. Comunicación oral. 48: 736-739. <http://www.sech07.uclm.es/gestion/pdf/6A03.pdf>. En CD.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Identificar si son nuevos y caracterizar el efecto sobre la calidad de algunos QTLs responsables de los atributos de calidad en melón. Para ello, se ha desarrollado una colección de líneas casi-isogénicas de melón o NILs a partir del cruzamiento entre dos parentales no climatéricos: el cultivar español tipo ‘Piel de Sapo’ (PS) (*Cucumis melo* var. *inodorus*) y la accesión exótica coreana PI 161375 ‘Shongwan Charmi’ (*Cucumis melo* var. *conomon*) (Eduardo et al. 2005; Moreno et al. 2008).

Objetivos específicos.

- **Determinación de la composición de la pared celular en NILs de melón con distinta firmeza de la pulpa y comportamiento fisiológico y sus parentales (PS y SC).** Se trata de evaluar las diferencias en composición de pared celular entre la NIL SC3-5-1 de carácter climatérico, y la NIL no climatérica y de mayor firmeza de la pulpa SC7-2. Estas NILs contienen introgresiones de PI 161375 sobre el fondo genético de PS en los grupos de ligamiento III y VII, respectivamente. Esto contribuirá a la identificación de genes de calidad del fruto de melón relacionados con su ablandamiento y firmeza.
- **Evaluación de la producción de compuestos volátiles aromáticos y sus diferencias en NILs de melón con distinto comportamiento fisiológico relacionado con líneas de referencia o el parental PS control.** Se trata de identificar los principales volátiles aromáticos producidos por las NILs de melón y correlacionar diferencias y distinto comportamiento fisiológico (líneas climatéricas 6M1 y ‘Védrantais’ vs. no climatéricas PS y ‘Nicolás’). Esto contribuirá a la identificación de QTLs del fruto de melón relacionados con la producción de aromas volátiles y su grado de dependencia del etileno.
- **Evaluación de calidad textural y aromática en recolección de líneas casi-isogénicas de melón no climatéricas con diferente textura respecto al parental PS.** Se trata de analizar las diferencias texturales y de producción de compuestos volátiles aromáticos y su relación en las NILs de melón no climatéricas SC7-1 (con

mayor firmeza de la pulpa), y SC10-2 (con menor dureza del fruto entero), con introgresiones en los grupos de ligamiento VII y X, respectivamente. Esto contribuirá a identificar QTLs y correlacionar atributos de textura y aromas en la recolección.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 Generalidades

1.1.1 El fruto del melón (*Cucumis Melo* L.). Origen.

La especie *Cucumis melo*., comúnmente llamada melón, pertenece a la familia *Cucurbitaceae*, subfamilia *Cucurbitoideae*, tribu *Melothrieae*, subtribu *Cucumerinae* y género *Cucumis* (Robinson y Decker-Walters, 1999). Las cucurbitáceas están asociadas al origen de la agricultura y las civilizaciones humanas y también están entre las primeras especies de plantas en ser domesticados en el Antiguo y el Nuevo Mundo (Bisognin et al. 2002). Dos subfamilias bien definidas, 8 tribus, unos 120 géneros y más de 800 especies de plantas han sido identificados de la dentro de la familia de las cucurbitaceas. Junto con el melón, los cultivos más importantes de esta familia basados en la producción total y en el área de explotación, en todo el mundo, son la sandía (*Citrullus lanatus* Thumb.), el pepino (*Cucumis sativus* L.) y la calabaza (*Cucurbita* spp.) (Nuñez-Palenius et al. 2008).

El melón es probablemente originario de África, aunque los últimos estudios moleculares sistemáticos sugieren Asia como su origen (Tzitzikas et al. 2009). Importado a Europa desde Persia y el Cáucaso aproximadamente hace 3000 años (Aubert y Pitrat, 2006), el melón se introdujo en América Central en 1516, en Virginia en 1609, y en Nueva York en 1629 (Ware y McCollum, 1980). Dentro de las especies de cucurbitáceas, *C. melo* es probablemente la más antigua como cultivo de planta alimenticia en todo el Mar Mediterráneo (Burger et al. 2010). En España, el cultivo del melón se remonta a la época romana y se considerado como un centro secundario de diversificación de la especie (Escribano y Lázaro, 2012).

1.1.2 Descripción botánica.

El término melón se refiere tanto a la planta como a la fruta caracterizándose por su carnosidad y la cual puede considerarse una falsa baya (Bapat et al. 2010). Es una planta herbácea anual de tallo rastrero con un sistema radicular muy ramificado con un crecimiento rápido entre los 30-40 cm del suelo donde alcanza su mayor densidad. Las raíces algunas veces superan el metro de profundidad. Las plantas de melón se caracterizan por tener comúnmente tallos herbáceos angulosos y recubiertos de

formaciones pilosas, pudiendo ser rastrero o trepador y ayudado por zarcillos en espiral. El ciclo de cultivo oscila entre 3 y 5 meses.

La mayoría de cultivares de melón son andromonoicos (con flores hermafroditas y masculinas en la misma planta), pero también se han encontrado formas monoicas (flores masculinas y femeninas) (Nuñez-Palenius et al. 2008). Las flores tienen la corola de color amarillo (Křístková et al. 2003) y se agrupan en inflorescencias fasciculadas en el caso de flores estaminadas (masculinas) mientras que las flores pistiladas (o hermafroditas, en caso de ser andromonoicas) son solitarias (Lira y Rodríguez-Arévalo, 1999). La polinización es cruzada. Al ser una planta monoica, necesita de polinizadores para la transportación de los granos de polen hacia los ovarios y aunque algunas veces se presentan flores hermafroditas, estas tienen un porcentaje bajo de autopolinización o son incapaces de autopolinizarse (Rashid y Singh, 2000). Las plantas monoicas de melón producen frutos alargados, mientras que las plantas andromonoicas generan frutos de forma redonda u ovalada.

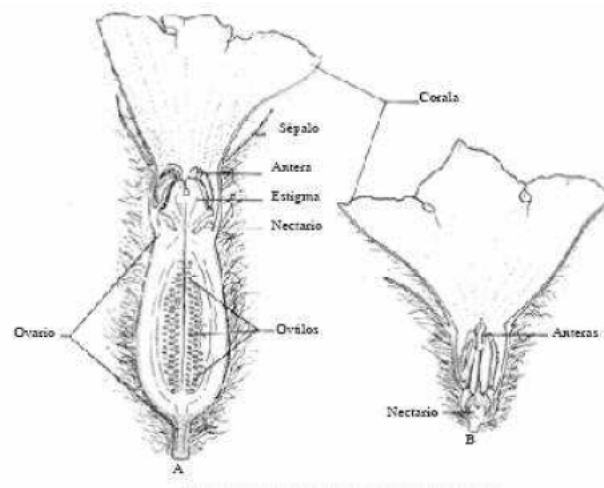


Figura 1. Flores hermafrodita (a) y masculina (b) presentes simultáneamente en la planta de melón (*Cucumis melo* L.) (Reyes-Carrillo et al. 2009).

Las hojas son simples, de tres o cinco lóbulos, y solitarias en los nudos, y pueden tener una gran variación en tamaño, color y forma. Los zarcillos nacen en el eje de la hoja y son simples (sin ramificar) (Nuñez-Palenius et al. 2008). El fruto de melón recibe el nombre botánico de peponoide y se caracteriza por su gran variabilidad de formas, siendo los tipos más cultivados los de forma redonda (*cantalupensis* y *reticulatus*) y ovalada ('Piel de Sapo'). No obstante, es posible encontrar desde formas achatadas hasta muy alargadas, como los de los de tipo *flexuosus*, pasando por frutos de forma

aperada o acampanada. La cáscara (epicarpo) es dura y perecedera pudiendo ser lisa o rugosa y con diversos patrones de coloración de la epidermis (verde oscuro, verde, amarillo, blanco, etc). Algunos cultivares se caracterizan por suturas longitudinales sobre la fruta (escriturado), mientras otros carecen de ellas. La superficie de la fruta puede ser lisa o poseer lenticelas (estructuras que aseguran la entrada de oxígeno, el intercambio gaseoso entre los tejidos internos y el exterior), que forman una textura acorchada (Escribano y Lázaro, 2012; Long 2005; Monforte y Álvarez, 2006).

La pulpa (mesocarpo) es carnosa, abundante y dulce, y suele presentarse en tres colores básicos, salmón, verde y blanco aunque existe toda una gama de colores intermedios. El pedúnculo es corto o largo y algunas veces con una abscisión entre el pedúnculo y el fruto coincidiendo con la maduración (Krístková et al. 2003; Monforte y Álvarez, 2006; Nee 1993).

Las semillas están situadas en la parte central del fruto en un hesperidio (tipo de baya modificada) formado por gajos no separados en los que se alinean todas las semillas o pepitas. Son fusiformes, aplastadas amarillas, blanquecinas o pardo claro y el color del margen no se diferencia del centro de la semilla. Varían en número entre cultivares, pero suelen estar en varios cientos por fruto. Cada semilla consta de varias capas, el perispermo, el endospermo y el embrión que consta de dos cotiledones grandes y planos y una radícula pequeña (Krístková et al. 2003; Mello et al. 2001). La longitud de las semillas varía desde los 5 mm a 8,5 mm de los grupos *Conomon* y *Agrestis* y los 9 mm en los grupos *Cantalupensis* e *Inodorus*. Los dos primeros grupos han sido clasificados dentro del tipo semilla pequeña y se caracterizan por tener pelos cortos en el ovario, mientras que los otros dos grupos son de tipo de semilla larga y tienen pelos largos en el ovario (Soltani et al. 2010).

Las líneas parentales ‘Piel de Sapo’ (PS) (*Cucumis melo* var. T111, grupo *inodorus*) y el cultivar ‘Songhwan Charmi’ PI 161375 (SC) (*Cucumis melo* var. *conomon*), utilizadas en el desarrollo de la colección de líneas casi-isogénicas (NILs) de melón, y las propias NILs son plantas hermafroditas o andromonoicas, caracterizadas por existir flores masculinas y bisexuales. La polinización de los parentales se realizó manualmente para evitar una polinización cruzada por ser cultivares homocigóticos (Monforte, comunicación personal). Las NILs sí que se fecundan por polinizadores, por lo que la mayoría de la polinización es cruzada.

1.1.3 Descripción genética.

El melón tiene un tamaño de genoma pequeño, estimado en 450-500 Mbp (1C), un genoma del cloroplasto estimado en 150 Kpb y un enorme genoma mitocondrial de 2400 kpb. Se ha demostrado la transmisión materna de los cloroplastos y la transmisión paterna del genoma mitocondrial (Pitrat 2008).

El género *Cucumis* comprende 32 especies, algunas de ellas cultivables como el melón y el pepino y el resto de origen silvestre. *Cucumis melo* junto con otras 29 especies dentro de este género, es una especie diploide con una base de 12 cromosomas diferentes (n , $2n=24$) (ó grupos de ligamiento LG) agrupados en un único conjunto. Las dos especies restantes *Cucumis sativus* y *Cucumis hystrix* Chacravarty tienen un número básico de 7 cromosomas ($n=7$) (Dane, 1991; Kerje y Gum, 2000; McCreight et al. 1993; Moreno et al. 2008). *Cucumis hystrix* Chacravarty es una rara especie originaria de Asia y endémica de la provincia de Yunnan en China, y es de particular interés debido a sus características morfológicas y bioquímicas siendo empleada para crear híbridos interespecíficos con pepino (*Cucumis sativus*) (Bisognin et al. 2002; Chen et al. 1997).

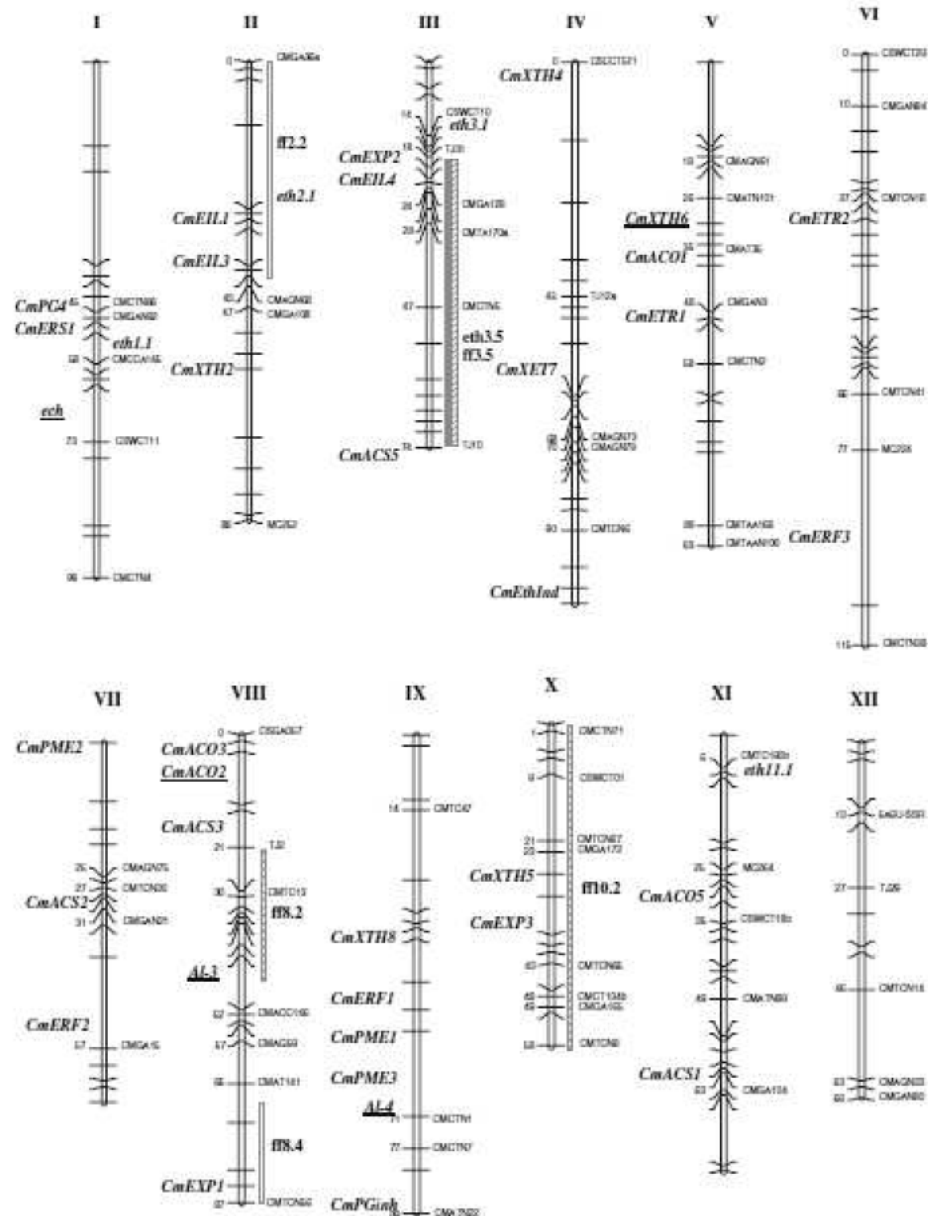


Figura 2. Mapa genético del melón (SC x PS, que contiene genes candidatos para la síntesis de etileno, enzimas de transducción de señales y degradación de la pared celular. Los genes candidatos están en *cursiva* en el lado izquierdo de cada uno de los doce grupos de ligamiento del melón (Moreno et al. 2008).

1.1.4 Clasificación.

Cucumis melo es una especie con un alto nivel de variabilidad molecular y morfológica tanto a nivel de hojas, planta como de características del fruto (Tzitzikas et al. 2009). En la actualidad, existen genotipos de diferente forma, tamaño, comportamiento fisiológico, color, textura, aroma, sabor e incluso forma de

almacenamiento (Obando-Ulloa et al. 2009a; Shalit et al. 2001). Estas diferencias se manifiestan en el contenido de azúcares solubles, ácidos orgánicos, metabolitos secundarios, pigmentos, compuestos volátiles aromáticos, ácido ascórbico o en el tipo de maduración y producción de etileno (Bapat et al. 2010). Esta variabilidad proporciona un tema interesante para la investigación de la base genética y fisiológica de la apariencia y calidad del fruto de melón, determinada últimamente por el sabor, especialmente el contenido de azúcar y el aroma (Burguer et al. 2010)

La clasificación del fruto del melón ha ido evolucionando con el tiempo y las diferentes propuestas de los investigadores. Hoy en día se distinguen dos grandes subespecies, *melo* y *agrestes* que a su vez se agrupan en diversas variedades (Tabla 1). No obstante, los cultivares de melón occidental modernos tienen una base genética relativamente estrecha porque pertenecen a un número limitado de variedades (principalmente *inodorus*, *reticulatus* y *cantalupensis*) (Tzitzikas et al. 2009).

Tabla 1. Clasificación de las especies de melón y sus variedades.

Especie: <i>Cucumis melo</i>	
Subespecie: <i>agrestes</i>	Subespecie: <i>melo</i>
Variedad	Variedad
<i>conomon</i>	<i>cantalupensis</i>
<i>makuwa</i>	<i>reticulatus</i>
<i>chinensis</i>	<i>adana</i>
<i>acidulus</i>	<i>chandalak</i>
<i>momordica</i>	<i>amer</i>
	<i>inodorus</i>
	<i>flexuosus</i>
	<i>chate</i>
	<i>tibish</i>
	<i>dudaim</i>
	<i>chito</i>

Fuente: Tzitzikas et al. 2009

Otra clasificación más reciente y simplificada es la propuesta por Nesom (2011), que incluye cuatro variedades [*melo* (incluyendo la variedad *cantalupo*), *inodorus*, *reticulatus* y *flexuosus*)] dentro de la subespecie *melo*, y siete variedades (*agrestis*, *chito*, *conomon*, *texanus*, *dudaim*, *chate* y *momordica*) dentro de la subespecie *agrestis*.

Descripción general de las variedades *cantalupensis*, *reticulatus* e *inodorus*, según Guis et al. 1998 y Pitrat et al. 2000.

- *Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud. Son plantas andromonoicas fundamentalmente pero también hay algunas formas monoicas. Los frutos son de tamaño mediano, con forma redondeada, superficie lisa o rugosa, y con frecuencia suturas, en caso de escriturado, es escaso. Pulpa anaranjada, aromáticos, climatéricos y alto contenido en azúcares.
- *Cucumis melo* var. *reticulatus*. Se trata de plantas andromonoicas con frutos achatados a ligeramente ovales y tamaño medio. Piel muy reticulada, con o sin costillas y pulpa desde color verde, blanco a rojo anaranjado. La mayoría son dulces y tienen un olor almizclado. Aromáticos y climatéricos.
- *Cucumis melo* var. *inodorus* Naud. Plantas andromonoicas con frutos que van de redondeados a elípticos. La superficie lisa o rugosa con o sin costillas, pulpa comúnmente blanca y jugosa, sin el típico sabor almizclado. Tienen por lo general una madurez tardía y larga conservación debido a la reducción o ausencia de producción de etileno (no climatéricos) en comparación con *cantalupensis* o *reticulatus*.

Una de las principales diferencias entre las variedades *inodorus* y *cantalupensis* es el carácter climatérico y no climatérico de sus frutos, respectivamente. Estudios recientes han demostrado que con la manipulación de unos pocos genes se pueden producir cambios profundos en el comportamiento climatérico (Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008).

A continuación se describen las principales variedades de melón existentes más consumidas en los diferentes mercados:

- Los melones reticulados (*Cucumis melo* L. var *reticulatus*) conocidos como cantalupos en Estados Unidos y rockmelon en Australia son los dominantes y más atractivos para la mayoría de los mercados (Youming et al. 1996). En Estados

Unidos, el consumo de melones reticulados es 4,5 veces superior al de los melones tipo inodoros. La preferencia por estos melones se debe a sus características organolépticas. Sin embargo, el potencial de conservación de los melones reticulados es menor que el de los melones inodoros (Laínez y Krarup, 2008). Son frutos climatéricos en los que la maduración está muy coordinada por el etileno con un periodo de almacenamiento relativamente corto (Jeong et al. 2007).

- El melón ‘Charentais’ (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*) es el de mayor producción en Francia (Aubert y Burger, 2004). Sus frutos son esféricos (10-20 cm de diámetro) con un peso que oscila entre los 0,5 y los 1,5 Kg, la piel es lisa y verdosa que amarillea con la madurez con líneas longitudinales más oscuras que lo delimitan en secciones. Se caracterizan por su pulpa anaranjada, siendo muy apreciados por su sabor fuerte y aromático. Sin embargo, sus propiedades para la conservación son pobres con un rápido ablandamiento (Goulao et al. 2008) y una vida útil muy corta (3-4 días), generalmente asociada a una fase climática aguda (Bauchot et al. 1998, Flores et al. 2001a).
- El melón ‘Galia’ (*Cucumis melo* var *reticulatus* L. Naud) es el tipo de melón más cultivado en Israel, tanto para exportación como para la mercado local (Fallik et al. 2001). Son frutos esféricos de 0,9 a 1,4 kg de peso, con cáscara fuerte y reticulada, de color amarillo-naranja verdoso y con carne de color blanco. Son frutos climatéricos y por tanto el etileno tiene un papel clave en su maduración. Se caracterizan por su gran flavor e intenso aroma, sin embargo los frutos recolectados antes de la madurez tienen una conservación limitada (2-3 semanas) incluso a bajas temperaturas de almacenamiento (Ergun et al. 2005).
- Los cultivares no climatéricos del grupo Inodorus tipo PS (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) son ampliamente cultivados en España, Brasil, Panamá, Costa Rica, Honduras y Senegal. La mayoría de este mercado se consume en España, pero alrededor del 25% de los frutos se exporta a otros países europeos como Holanda, Inglaterra, Italia o Francia (Obando-Ulloa et al. 2009a). PS es junto con ‘Rochet’ dos de las principales variedades de cultivos comerciales de melón recolectadas entre junio y septiembre. Los frutos son de forma ovalada, color verde, cáscara gruesa con la superficie reticular, no aromáticos y con un mesocarpio firme y una textura crujiente. La pulpa es dulce y con un color que entre el blanco y el amarillo

claro y sus semillas han desarrollado resistencia a *Fusarium* (Villanueva et al. 2004, Obando-Ulloa et al. 2009a). El melón PS se caracteriza por no tener una producción autocatalítica de etileno y generalmente tiene una tasa de maduración lenta asociada con una vida útil prolongada (Pech et al. 2008a).

- El melón ‘Honeydew’ y otras variedades de larga vida como el PS no producen un estallido grande de etileno, y por lo general no forman una zona de abscisión en la madurez comercial (Zheng y Wolff 2000). La pulpa del melón ‘Honeydew’ puede ser verde o anaranjada. Los frutos de pulpa lisa anaranjada están cada vez más disponibles en Estados Unidos debido a su potencial como producto recién cortado debido a su mayor seguridad microbiológica frente a variedades cantalupo, así como su capacidad para satisfacer nuevas demandas de los consumidores (Saftner et al. 2006).



Figura 3. Frutos de melón a) ‘Charentais’ (*Cucumis melo* L. var. *cantalupensis*). b) ‘Piel de Sapo’ (*Cucumis melo* L. var. T111, grupo *inodorus*). c) ‘Galia’ (*Cucumis melo* var *reticulatus* L. Naud).

1.1.5 Aspectos nutricionales.

El melón es un fruto con bajo aporte calórico, grasa y de sodio y se ha relacionado como una buena fuente de ácido ascórbico, pro-vitamina A (β -caroteno), ácido fólico y potasio y con un alto contenido de azúcares libres y agua (Lester y Crosby, 2002, Li et al. 2006, Park et al. 2009). El agua es el principal componente de la pulpa de melón alcanzando hasta el 90% del peso total seguido de los carbohidratos que son el siguientes componentes en importancia con un 9% del peso total (Duke 2006). En la población española, la ingesta de melón tipo PS se sitúa en 22,3 g materia fresca/persona*día, siendo la porción comestible 13,4 g/persona*día. Este consumo, junto con el de otras frutas y verduras, contribuye a proporcionar una parte importante

(más del 60%) del aporte de polifenoles no extraíbles de la dieta española (Arranz et al. 2010).

El β -caroteno es especialmente útil para el sistema inmune debido a su potencial antioxidante que genera efectos beneficiosos frente a patologías como el cáncer, en la reducción de ataques cardíacos, derrames cerebrales, enfermedades cardiovasculares y trastornos en la visión como la ceguera nocturna y las cataratas (Lester 2006a). El ácido ascórbico o vitamina C es la vitamina más importante para la salud humana presente en frutas y hortalizas (Lee y Keader, 2000). Tiene un papel importante en la fisiología y calidad de productos vegetales y su contenido en los alimentos varía en función de diversos factores, entre los que se encuentran el genotipo (Dos-Santos et al. 2009). La vitamina C es otro importante antioxidante que se ha relacionado con el mantenimiento de un sistema inmunológico saludable, reduciendo la severidad de los resfriados y actuando en la prevención de enfermedades cardiovasculares. El ácido fólico es una vitamina que interviene en la construcción de cadenas de proteínas y en la reducción de homocisteína, un compuesto implicado en la enfermedad cardiovascular. Otros efectos beneficiosos son la mejora del estado de ánimo, el sueño y apetito. Un aporte adecuado de esta vitamina es muy importante durante el embarazo para el correcto desarrollo del feto y la prevención de espina bífida en niños recién nacidos (Lester 2006a).

Tabla 2. Composición nutricional media de 100 gramos de materia fresca de pulpa de melón ‘Cantalupo’ (*Cucumis melo* L. var *reticulatus*) y ‘Honeydew’ (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*).

Composición	Honeydew	Cantalupo
Calorías	36	34
Agua	89,8	90,2
Carbohidratos (g)	9,1	8,8
Azúcares (g)	8,1	7,9
Sacarosa (mg)	2480	4350
Fructosa (mg)	2680	1540
Glucosa (mg)	2960	1870
Fibra (g)	0,8	0,9
Cenizas (g)	0,4	0,7
Lípidos totales (g)	0,1	0,2
Grasa saturadas (g)	0,0	0,1
Grasas monoinsaturadas (g)	0,0	0,0

Grasas poliinsaturadas (g)	0,1	0,1
Proteínas (g)	0,5	0,8
Vitamina A (UI)	50	3382
Ácido Ascórbico (mg)	18,0	36,7
Vitamina E (alfa tocoferol) (mg)	0,0	0,1
Tiamina (mg)	0,0	0,0
Riboflavina (mg)	0,0	0,0
Niacina (mg)	0,4	0,7
Ácido pantoténico (mg)	0,2	0,1
Ácido fólico (ug)	19	21
Minerales totales (g)	0,27	0,32
Sodio (mg)	18	16
Potasio (mg)	228	267

Fuente: USDA. United States Department of Agriculture. Nutrient Database 2010.

El potasio (K) es un electrolito importante para la salud siendo fundamental en la secreción de insulina, reducción de la presión arterial alta, enfermedades coronarias, derrame cerebral y el endurecimiento de las arterias. Aunque estos fitonutrientes han sido identificados en melón, poco se sabe de cómo afecta el cultivar, el tamaño del fruto y el tipo de suelo en su contenido en los frutos poscosecha. Estudios realizados en varios cultivares de melón indicaron que el genotipo y el tamaño del fruto afecto al contenido de fitonutrientes, siendo los frutos de mayor tamaño los que mostraron una mayor concentración de ácido ascórbico, β -caroteno, potasio y ácido fólico (Lester y Crosby, 2002). Melones obtenidos de plantas cultivadas en suelo arcilloso tuvieron mejores atributos sensoriales en comparación con los frutos obtenidos de plantas cultivadas en suelo de arenoso (Belt-Garber et al. 2005).

1.1.6 Importancia económica.

El melón es un cultivo de gran importancia comercial en muchos países del mundo, y entre ellos los países Mediterráneos. La superficie cultivada y la producción de melones en todo el mundo se sitúa en torno a 1,3 millones de hectáreas y 26 millones de toneladas, respectivamente. Su cultivo es frecuente en las regiones templadas debido a su buena adaptación al suelo y al clima. Se trata de un fruto muy popular en la temporada de verano, debido a la frescura, suavidad y agradable aroma de la pulpa (Alsmeirat y El Assi, 2010, Tang et al. 2010).

Junto a China, Turquía e Irán, los principales países productores de melón en 2010 (FAO 2010), se sitúan España y Estados Unidos (DESCA 2010). El melón es un producto bien conocido y aceptado por los consumidores europeos con producciones importantes en España e Italia entre otros países. En los últimos años la superficie cultivada de melón y su producción ha ido aumentando. En la Unión Europea la producción de melón alcanzó 2,3 millones de toneladas en el 2008, creciendo un 4% en relación al año anterior. La producción en España ascendió a 1,1 millones de toneladas en el 2008, 653 mil en Italia y 265 mil en Francia. Las exportaciones de melón de la UE en el 2008, fueron de 32723,1 toneladas, siendo los principales mercados de exportación: Suiza (18875,5 toneladas), Noruega (5053,8 toneladas), Rusia (3663,9 toneladas) y Croacia (93,6). Asimismo, las importaciones de melón crecieron en el 2008 alcanzando un total de 336,9 mil toneladas, siendo los principales proveedores de esta fruta a la UE: Brasil (171798 toneladas), Marruecos (56544,6 toneladas), Costa Rica (50739,4 toneladas), Panamá (19904,6 toneladas) y Honduras (14230,8 toneladas) (DESCA 2010)

En España el cultivo del melón es de gran importancia, con una producción constante, aunque según datos recientes de la FAO (2013) ha descendido en los últimos años (Tabla 3). La superficie cultivada en España supera las 30000 hectáreas, con una producción anual que supera las 1000 toneladas (Tablas 3, 4, 5 y 6) lo que supone un 4% de la producción mundial. La Región de Murcia, especializada en hortalizas de flor, hoja y fruto, supera el 20% de estos valores (Tablas 4, 5 y 6), siendo la principal zona de producción nacional en alcachofa, brócoli, lechuga o melón (Escribano y Lázaro, 2012; FAOSTAT 2013; INFO 2012; MARM 2010). A pesar de ello, las exportaciones de melón así como de otras cucurbitáceas han sido tradicionalmente modestas en comparación con otras frutas probablemente debido a problemas de variabilidad en su calidad y a la estacionalidad de la producción (Dos-Santos et al. 2007).

Tabla 3. Superficie cultivada (hectáreas, Ha), producción de melón (toneladas, TM) y rendimiento (Hg/Ha) en España durante el periodo 2007-2011.

AÑO	SUPERFICIE CULTIVADA (Ha)	PRODUCCIÓN (t)	RENDIMIENTO (Hg/Ha)
2007	38688	1183154	305819,38
2008	33388	1042439	312219,66
2009	31327	984786	314356,94
2010	30601	626639	204777,29
2011	28561	871996	305310

Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO 2013). <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>

Tabla 4. Superficie cultivada y producción de melón (miles de toneladas, t) en España durante los años 2008-2010.

SUPERFICIE (Miles de Ha)					PRODUCCIÓN (Miles de t)			
	Definitivo	Provisional	Avance	2010	Definitivo	Provisional	Avance	2010
Mes (*)	2008	2009	2010	2009=100	2008	2009	2010	2009=100
4	33,4	31,4	31,1	99,2	1042,40	1007,00		

Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).

(<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/superficie/superficie.htm>)

Tabla 5. Superficie cultivada de melón en las distintas Comunidades Autónomas de España durante los años 2008-2010.

Comunidad Autónoma	SUPERFICIE (Ha)			
	Definitivo	Provisional	Abril	2009=100
	2008	2009	2010	2009=2010
Galicia	0	0	0	0,0
Principado de Asturias				0,0
Cantabria				0,0
País vasco	0	0	0	0,0
Navarro	23			0,0
La Rioja	9	10	8	80,0
Aragón	10	2	2	100,0
Cataluña	557	509	498	97,8
Baleares	147	130	200	153,8
Castilla y León	128	114	120	105,3

Madrid	501	1600	1400	87,5
Castilla La Mancha	12368	10566	11301	107,0
Comunidad Valenciana	1572	1385	1641	118,5
Región de Murcia	5475	5500	5500	100,0
Extremadura	3470	3000	2670	89,0
Andalucía	8982	8377	7593	90,6
Canarias	164	170	170	100,0
ESPAÑA (total)	33388	31363	31103	99,2

Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).

<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/superficie/superficie.htm>

Tabla 6. Producción de melón en las distintas Comunidades Autónomas de España durante los años 2008-2010.

Comunidad Autónoma	PRODUCCIÓN (miles de t)			
	Definitivo	Provisional	Abril	2009=100
	2008	2009	2010	2009=2010
Galicia	0	0	0,0	0,00
Principado de Asturias				0,00
Cantabria				0,00
País vasco	0	0		0,00
Navarro	0,4			0,00
La Rioja	0,2	0,2	0,2	0,00
Aragón	0,5	0	0,0	0,00
Cataluña	10,5	9,9	0,0	0,00
Baleares	3,8	3,5		0,00
Castilla y León	1,7	1,5		0,00
Madrid	12	25	0,0	0,00
Castilla La Mancha	363,4	348,1	0,0	0,00
Comunidad Valenciana	40,7	39,1	0,0	0,00
Región de Murcia	234,7	235		0,00
Extremadura	86,4	76,5	0,0	0,00
Andalucía	283,8	264,4	0,0	0,00
Canarias	4,2	3,9	0,0	0,00
ESPAÑA (total)	1042,3	1007,1	0,0	0,00

Fuente: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).

<http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/superficie/superficie.htm>

Tabla 7. Producción y superficie cultivada de melón en la Región de Murcia en el año 2012.

Cultivo	SUPERFICIE EN PRODUCCIÓN (Ha)	PRODUCCIÓN (t)
Melón ‘Galia’ y otros	3125	125000
Melón Verde	1657	58000
Melón Amarillo	892	40150
TOTAL	5674	223150

Fuente: Federación de Cooperativas Agrarias de Murcia (FEOCAM).

<http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/03796.pdf>

Alemania, Francia, Reino Unido, Países Bajos, Portugal, Bélgica y Suecia son por este orden (Fig. 4) los principales países exportadores de la producción de melón en España (PROEXPORT 2009). En la Región de Murcia, el melón (junto con lechugas, limón, brócoli y coliflor, vino, uva de mesa, tomate, melocotón, legumbres y hortalizas congeladas y pimentón) se situó entre los diez productos agroalimentarios más exportados en 2011, con un valor de 91 millones de euros (INFO 2012).

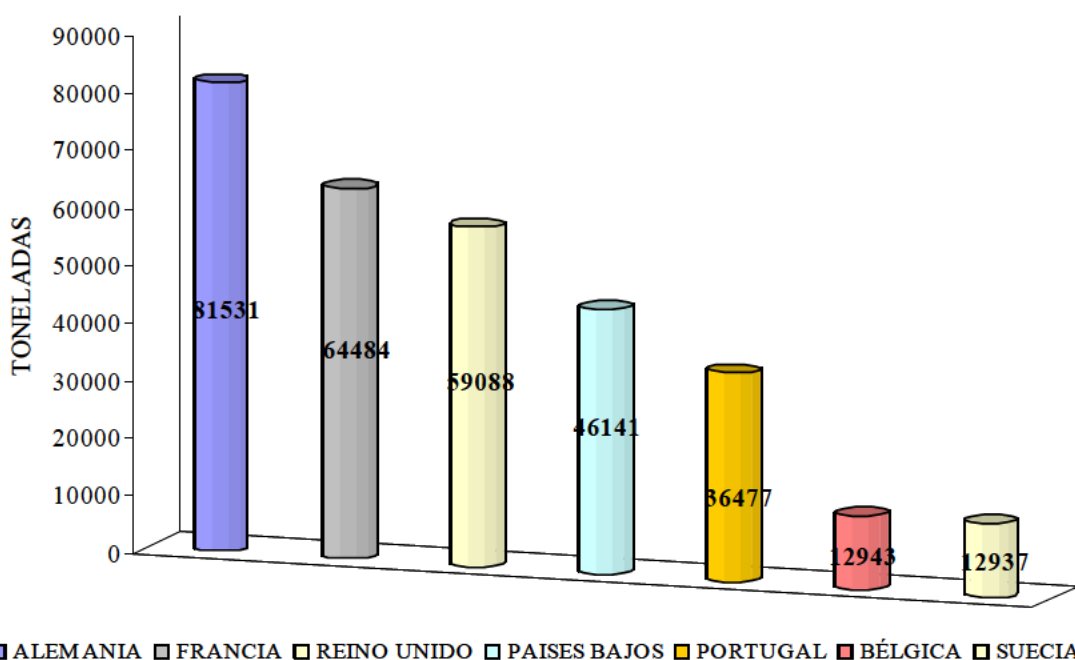


Figura 4. Principales países exportadores de melón producido en España en el año 2008 (PROEXPORT 2009).

1.1.7 Cultivo.

El cultivo del melón es característico de las zonas con climas cálido-secos, aunque soportan algunas veces climas más templados, aunque no fríos. El melón es una especie muy exigente en temperatura, variando según cultivar. En el desarrollo de todo el cultivo del melón la temperatura nunca debe ser inferior a 18°C. La temperatura óptima para una buena polinización son los 20-21°C. La germinación de las semillas se da cuando el suelo alcanza una temperatura de 20-23°C. Durante el desarrollo vegetativo de la planta debe mantenerse una temperatura atmosférica de 25-30°C y para la floración de 20-25°C. En periodo de floración los días largos con temperatura muy alta tienden a generar mayor número de flores estaminadas (masculinas), mientras que los días cortos con temperaturas más bajas inducen el desarrollo de flores con ovarios (Maroto 1994, 1997). Por tanto, el cultivo del melón como el resto de las especies pertenecientes a la familia de las cucurbitáceas, necesita de una alta intensidad lumínica para obtener un óptimo rendimiento (Robinson y Decker-Walters, 1997). Las necesidades lumínicas varían en relación a la etapa de desarrollo del cultivo, situándose en torno a 10 horas·día⁻¹ en las fases de desarrollo general, cuaje y floración y las 12 horas·día⁻¹ en la etapa de maduración del fruto.

No todos los cultivares de melón son igualmente resistentes a la sequía ni reaccionan de la misma manera frente a una situación de déficit hídrico. Las necesidades hídricas del melón tienen que ser especialmente satisfechas durante el periodo de crecimiento y maduración de los frutos para obtener adecuados rendimientos y calidad, evitando riegos excesivos. El melón responde al riego incrementando el tamaño de los frutos y el crecimiento de la planta, mientras que producciones con riegos restringidos generan frutos con mayor contenido en sólidos solubles. Se debe evitar el estrés hídrico, puesto que influye en el rajado de los frutos afectando negativamente al crecimiento foliar y reduciendo la cosecha final. El cultivo se desarrolla en el período estival, cuando la demanda evaporativa es alta y las precipitaciones son prácticamente inexistentes, por lo que es preciso recurrir al riego para obtener producciones que permitan una adecuada rentabilidad económica. La tolerancia a la sal de melón es muy variable y depende de la variedad y el tipo de cultivo siendo un cultivo potencial para el riego con aguas salinas (Botía et al. 2005; Gil et al. 2000; Ribas et al. 2000).

Referente a la humedad relativa, el melón es una especie a la que no le favorecen humedades muy altas, debido a que aumenta la incidencia de enfermedades en el cultivo

Al inicio del desarrollo de la planta la humedad relativa debe ser del 65-75%, en floración del 60-70% y en fructificación del 55-65% (Maroto 1995).

Se cultiva en varios tipos de suelo, aunque prefiere aquellos de textura media o arenosos, ricos en materia orgánica, profundos, con buena aireación y pH comprendido entre 5,6 y 6,8. Deben ser suelos bien drenados, ya que los encharcamientos son causantes de asfixia radicular y podredumbre en los frutos. En general es una especie de moderada tolerancia a la salinidad tanto del suelo (CE de $2,2 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$) como del agua de riego (CE de $1,5 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$), aunque cada incremento en una unidad sobre la conductividad del suelo dada supone una reducción del 7,5% de la producción (Mendoza et al. 2000; Robinson y Decker-Walters, 1999). La sensibilidad del cultivo a la salinidad del suelo a menudo cambia de una etapa de desarrollo a otra (Botía et al. 2005).

Los elementos minerales esenciales para la nutrición de la planta se dividen en macronutrientes (N, P, S, K, Ca y Mg) y elementos traza o microelementos (Fe, Mn, Zn, Mo, B y Al). Para la producción del melón y otras cucurbitáceas se emplea una base fertilizadora con los principales elementos (N:P:K) antes de la plantación (Long 2005).

El 67% de la superficie cultivada de melón en España es fertigada. El exceso de nitrógeno (N) puede tener un impacto negativo, disminuyendo la producción y la calidad de la fruta, contaminando las aguas subterráneas, y desde el punto de vista de la salud, ya que el nitrato se acumula en la pulpa de la fruta. El límite máximo de la fertilización con N es de 135 a $110 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ en las zonas vulnerables, de acuerdo a la zona de aplicación. Normalmente se superan los límites establecidos, sin embargo según resultados obtenidos en melones PS (*Cucumis melo* L., var. *inodorous*, cv. Sancho) cultivados en Ciudad Real, se podría obtener un rendimiento potencial del 95% con una aplicación de N de $93 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (Castellamos et al. 2010).

Son numerosas las plagas y enfermedades causantes de grandes pérdidas en el cultivo del melón de todo el mundo. Entre los agentes causantes se encuentran bacterias, hongos y virus, variando su distribución y su impacto a nivel mundial. Entre las enfermedades importantes causadas por hongos están la marchitez en verde sin que las hojas amarillean o desarrollen color y causada por *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, el oidio o ceniza provocado por *Sphaerotheca fuliginea*, la plaga foliar por *Alternaria cucumerina* y el chancro gomoso del tallo causado por *Didymella bryoniae*. Las enfermedades virales se traducen en importantes pérdidas económicas de los melones y entre ellas se pueden citar el virus del mosaico del pepino (CMV, Cucumber Mosaic

Virus), virus de la mancha anular de papaya (PRSV, Papaya Ring Spot Virus), virus del mosaico de la sandía (WMV-2, Watermelon Mosaic Virus-2), virus del mosaico amarillo del calabacín (ZYMV, Zucchini Yellow Mosaic Virus) y virus del mosaico de la calabaza (SqMV, Squash Mosaic Virus) (Lecoq et al. 1994) y el virus del cribado del melón. (MNSV, Melon Necrotic Spot Virus) entre otros.

Los cultivos de melón se ven infestados por especies de insectos como la mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*), pulgón o áfido (*Aphis gossypii*), minador (*Liriomyza trifolii* y *Liriomyza huidobrensis*) mosca de la fruta, y sus daños pueden ser causados de manera directa a través de la alimentación de los insectos o bien indirecta a través de la transmisión de enfermedades virales. Los áfidos o pulgones son conocidos por transmitir tanto luteovirus (Dogimont et al. 1995) y potyvirus. La mosca de la fruta del melón (*Dacus* spp.) causa graves daños a los frutos de melón, que se inicia con la oviposición de la mosca hembra en frutos inmaduros (Robinson y Decker-Walters, 1999). La araña roja (*Tetranychus urticae*), orugas (*Spodoptera*, *Chrysodeixis*, *Heliothis* y *Ostrinia*) y trips (*Frankliniella occidentalis*), junto con la mosca blanca, el áfido y los minadores de la hoja son la principales plagas que afectan a los cultivos de melón en España.



Figura 5. Especies de insectos causantes de pérdidas en los cultivos de melón. a) Mosca blanca (*Trialeurodes vaporariorum*). b) Araña roja (*Tetranychus urticae*). c) Trips (*Frankliniella occidentalis*). Internet.

1.1.8 Cosecha y conservación.

La cosecha del melón comienza transcurridos 70-90 días desde la siembra en campo y son varios los parámetros que se utilizan como indicadores de un óptimo grado de madurez. Existen ligeras variaciones de estos tiempos en el caso de accidentes climatológicos que afecten a la floración o al cuajado durante el cultivo.

El valor de sólidos solubles totales (SST) totales medido con refractómetro manual o digital en grados Brix (°Brix), es un buen índice de madurez mínima en melón. Numerosos estudios constatan que si el fruto está unido a la planta durante más tiempo la misma es capaz de llegar hasta el máximo potencial de acumulación de azúcares y ácidos que contribuyen a incrementar el nivel de sólidos solubles (Flores et al. 2001a). El potencial máximo de acumulación de sólidos solubles totales depende de la variedad, y fundamentalmente del estado de cobertura foliar de la misma y del manejo de la plantación y su estado fitosanitario, así como en factores ambientales (temperatura y radiación especialmente). Un valor de SST superior a 10°Brix es el mínimo aconsejable en el melón tipo PS. Sin embargo, valores entre 12 y 15°Brix pueden dar un melón de una calidad óptima porque esta acumulación estará relacionada con el desarrollo de un sabor (gusto y aroma) adecuado (Fernández-Trujillo, comunicación personal). El fruto se debe recolectar cuando alcanza el mayor contenido en SST puesto que estos prácticamente no aumentan una vez el fruto se separa de la planta.

Entre los índices de cosecha está el desarrollo de una zona de abscisión o grado de separación del fruto del pedúnculo, en los frutos que maduran en la planta. El grado de separación se denomina “slip”. La separación parcial a total de la zona de abscisión es un buen indicador de la madurez completa y el tiempo de cosecha. A mayor desprendimiento, mayor maduración, mayores atributos (sabor, aroma, etc) y menor conservación en poscosecha (almacenamiento) por lo tanto al momento de la cosecha determina el tiempo que se necesita almacenar el producto. En Estados Unidos, la práctica comercial para la cosecha de melón reticulado es esperar hasta que los melones se desprendan $\frac{3}{4}$ ó por completo de la planta (Beaulieu et al. 2004). La etapa de “desprendimiento completo” (full slip) en los melones reticulados es la fase de maduración en el que el melón se despega fácilmente del pedúnculo y donde la piel comienza a tener una apariencia ligeramente amarilla en el reticulado.

El cambio de coloración de la corteza del fruto es otro índice de madurez en la cosecha. Es variable y puede ser verde, verde claro, verde oscuro, amarillo, amarillo claro, amarillo oscuro. La mancha de color tierra, se utiliza para definir la madurez en melones tipo PS y se localiza en la parte de la fruta en contacto con el suelo. Su color es amarillo o de color amarillo-crema en un melón maduro, y el color de verde a blanco del fondo indica que probablemente el melón PS no haya madurado del todo (Obando et al. 2008).

El desarrollo de un adecuado escriturado en la epidermis de los fruto de melón se utiliza como indicativo de calidad comercial y madurez en cultivares del grupo *Inodorus* (como el tipo PS) (Obando et al. 2007).

La textura de los frutos es otro indicador del grado de madurez. Se emplea un texturómetro como instrumento de medida siendo los valores idóneos para el transporte entre 0,5 y 1,5 Kg·cm².

Los melones es mejor cosecharlos con el fresco de las primeras horas de la mañana, especialmente en el caso de los frutos destinados a la exportación o el almacenamiento a largo plazo. Una vez cosechada la fruta debe mantenerse en frío (nunca por debajo de 2°C) y lo ideal, es que sea previamente pre-enfriada antes de su introducción en la cámara, o almacenada en un lugar fresco y con una adecuada humedad relativa del 85-90%. La fruta almacenada a una temperatura alta y/o con un bajo nivel de humedad pierden peso rápidamente y su comercialización baja en un plazo de tiempo más corto (Dimsey 1995; Lester y Burton, 1986).

Para maximizar la vida útil de almacenamiento es importante eliminar el calor del campo lo más rápido posible. Las salas de refrigeración no son un método efectivo ya que el proceso es demasiado lento. Antes de la clasificación y embalaje, la fruta debe ser enfriada a menos de 15°C dentro de las 8 horas siguientes a la cosecha. Los melones pueden ser pre-enfriados antes de su clasificación y/o inmediatamente después. Los métodos más eficaces de pre-refrigeración son los sistemas de refrigeración por aire forzado o el hidroenfriamiento refrigerado. La ventaja de estos métodos son la rapidez y el manejo de grandes cantidades de fruta. Un método más barato pero menos efectivo de pre-enfriamiento es la ducha de los melones con agua enfriada por evaporación. La temperatura de las frutas bajará hasta el punto de rocío hasta eliminar gran parte del calor inicial del campo Este procedimiento está más adaptados a las zonas interiores de baja humedad. Por otra parte, un manejo cuidadoso de los frutos es de gran importancia, ya que los melones se dañan fácilmente, siendo los golpes o heridas focos ideales para el desarrollo de infecciones y podredumbres. La fruta debe ser cuidadosamente colocada en las cajas para su transporte, evitando en todo momento movimientos bruscos (Dimsey 1995).

La mayoría de las pérdidas de fruta de miembros de la familia de las cucurbitáceas tales como grietas, exudación, sobremaduración, daños por frío con o sin síntomas asociados decadencia son por alteraciones de la fruta durante la cosecha o después del

almacenamiento en frío. El comportamiento poscosecha del melón y de caracteres relacionados están por lo general bajo un complejo control genético y fuertemente influenciado por varios factores ambientales tales como temperatura y tiempo de almacenamiento, atmósfera que rodea la fruta, humedad relativa y el estrés medio ambiental (natural o inducido) como el desprendimiento o la radiación ultravioleta (Fernández-Trujillo et al. 2008).

Los cultivares de melón de la variedad cantalupensis (*Cucumis melo* L. subsp. *melo* var. *cantalupensis* Naudin) muestran ablandamiento y rugosidad después de unas dos semanas a temperatura ambiente. El reticulado de la epidermis favorece las altas tasas de transpiración que contribuyen a una vida de almacenamiento relativamente corta. Se recomienda un preenfriamiento rápido junto con un transporte y almacenamiento del melón a temperaturas entre 2 y 7°C y el 95% de humedad relativa (HR) para su máxima conservación. Las temperaturas más bajas sólo se puede utilizar durante períodos cortos de tiempo, porque los frutos son susceptibles al daño por frío Sin embargo, el almacenamiento de algunos cultivares a 0°C podría resultar beneficioso ya que podría disminuir la actividad metabólica y de patógenos, y aumentar el período de conservación y calidad (Krarup et al. 2009).

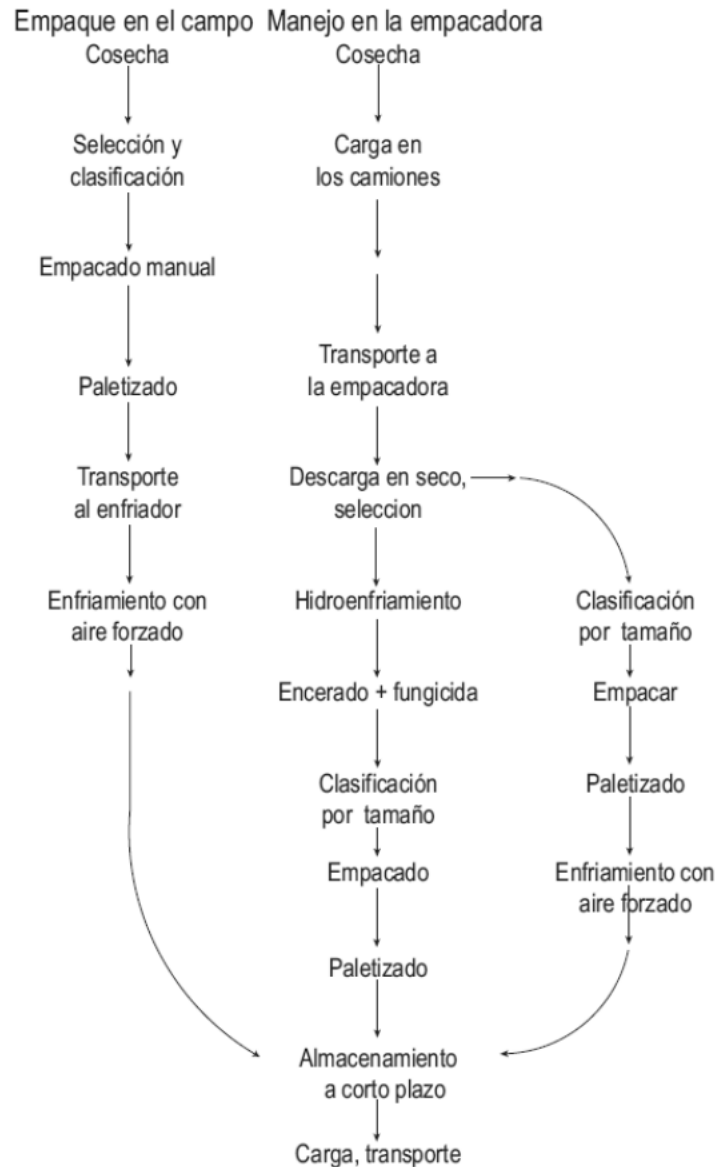


Figura 6. Diagrama de flujo del manejo poscosecha de melones (Cantwell y Kasmire, 2007).

1.2 Calidad del fruto del melón.

La calidad sensorial y nutricional de la fruta está altamente determinada por su contenido en azúcares, ácidos orgánicos, aromas volátiles y textura. Estos atributos sensoriales se desarrollan fundamentalmente durante la fase de maduración del fruto y son controlados por vías metabólicas específicas reguladas a nivel molecular mediante la expresión de genes específicos (Ayub et al. 2008).

El melón es una de las frutas preferidas de los consumidores debido principalmente a su sabor refrescante y dulce y su agradable aroma y en frutos de melón el contenido de azúcar y ácido en las frutas maduras son factores cruciales que influyen en el sabor y la demanda de los consumidores (Burger et al. 2003; Tang et al. 2010).

La calidad organoléptica del melón, incluyendo el color de la pulpa, dulzor y aroma, depende directamente de su composición en metabolitos primarios, isoprenoides y compuestos volátiles, que en general han sido descritos utilizando una serie de análisis específicos. Estudios recientes de metabolómica señalan que junto al tomate, el melón se confirma como una planta modelo alternativa para dilucidar el metabolismo en general y la maduración en particular de las frutas carnosas (Bernillon et al. 2013).

En frutos climatéricos, tales como el melón, el etileno regula el control de la mayoría de las rutas metabólicas responsables del desarrollo de la calidad sensorial y la mayoría de los eventos de maduración (Fig. 7). Sin embargo, existen eventos de la maduración que no responden a este control del etileno (Ayub et al. 2008). La acumulación de azúcares y ácidos orgánicos en las vacuolas celulares del mesocarpio durante la maduración del melón es un proceso independiente de etileno, y su concentración determina aceptación de los consumidores (Obando-Ulloa et al. 2009a).

En un trabajo previo de Obando-Ulloa et al. (2009a), se han identificado QTLs relacionados con la producción de azúcares y ácidos orgánicos en NILs de melón. Estos QTLs pueden ayudar a desarrollar nuevos cultivares de melón, con mayores beneficios para los consumidores.

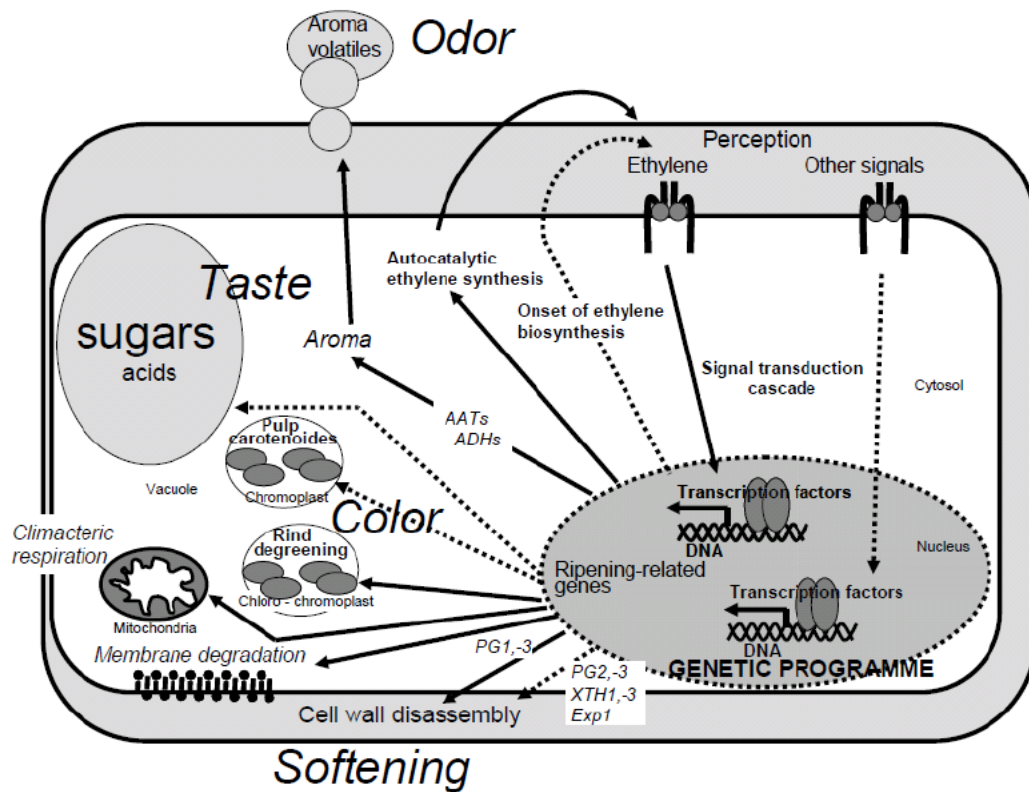


Figura 7. Representación esquemática de la regulación de la maduración de la fruta y desarrollo de la calidad sensorial del melón. Las flechas representan: las vías etileno-dependiente (línea continua) y etileno-independiente (línea discontinua). AAT: alcohol aciltransferasa; ADH: alcohol deshidrogenasa; PG: poligalacturonasa; XTH: endotransglicosilasa / hidrolasa; Exp: expansina (Ayub et al. 2008).

1.2.1 Azúcares.

El melón es una fruta muy atractiva para los consumidores por su dulzor, determinado especialmente por la acumulación de sacarosa durante las etapas finales del desarrollo del fruto (Dai et al. 2010). El contenido en azúcares juega un papel importante en propiedades como sabor, apariencia y textura de los frutos. En general, los cultivos de melón presentan un alto contenido en azúcares, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa que se han descrito como los componentes principales del mesocarpio en melón, y junto al agua, son parte del contenido de sólidos solubles totales y de la calidad de la fruta. Estos azúcares y su proporción relativa, en especial glucosa/fructosa dan el dulzor característico del melón. Si bien el contenido en sólidos solubles está solo parcialmente correlacionado con el dulzor, y un alto contenido en SST no siempre define una adecuada calidad del melón, es un criterio fácil de medir y

aplicado a menudo para juzgar la calidad del fruto del melón cosechado. El contenido en SST está principalmente determinado por el contenido en azúcar, que corresponde mayoritariamente a fenómenos de acumulación de sacarosa ocurridos durante la maduración e influenciados por las enzimas que actúan en el metabolismo de la sacarosa (Beaulieu et al. 2003; Obando-Ulloa et al. 2009a; Zhang y Li, 2005). Por tanto, la sacarosa es el principal azúcar responsable del sabor dulce, ya que supone el 50% o más de entre todos los sólidos solubles y se encuentra tanto en la corteza como en la pulpa de los frutos de melón (Albuquerque et al. 2006).

Dos enzimas, sacarosa fosfato sintasa (SFS) e invertasa ácida (AI) han sido descritas como determinantes de la acumulación de sacarosa en el melón (Tang et al. 2012). Los incrementos en sacarosa van acompañados por un descenso acentuado en la actividad enzimática de la invertasa ácida y neutra y un incremento de la actividad de la enzima SFS y sacarosa sintasa. Una alta actividad de SFS se considera un factor determinante en la concentración final de sacarosa en los cultivares de melón, y se ha atribuido una alta acumulación de sacarosa a un gen único recesivo denominado *suc* (Beaulieu et al. 2003). Recientes resultados obtenidos en tres genotipos de melón; ‘Flavor N°.4’ un nuevo genotipo de melón ‘Hami’ y sus parentales ‘Shouxing’ y ‘Suangua’, la acumulación de sacarosa puede ser regulada de dos modos. En un modo, aumenta la sacarosa con el aumento de la actividad de SFS, mientras que en el otro modo, la sacarosa aumenta cuando la actividad de AI se mantiene a un bajo nivel (de Tang et al. 2012). Estos procesos son independientes a la acción del etileno, pero enzimas involucradas en este fenómeno como la poligalacturonasa (PG) o la galactosidasa (GAL) son dependientes de la acción del etileno (Pech et al. 2002).

En melón, a diferencia de otras frutas donde la acidez y especialmente la relación azúcar/ácido es el principal indicador de calidad, existen variedades de melón dulce de los grupos *reticulatus*, *inodorus* y *cantalupensis* donde el dulzor es el principal parámetro de calidad. Los genotipos de *C. melo* que acumulan grandes niveles de ácidos no acumulan grandes niveles de azúcares (Burger et al. 2003; Cohen et al. 2012). En la actualidad se han desarrollado cultivares de melón como ‘Flavor N°. 3’ con una combinación de los sabores dulce y amargo incrementando la reserva genética del cultivo y así conducir a una mejora de la calidad del fruto del melón ya que el equilibrio entre azúcar y ácido es un factor importante para el sabor de este fruto (Tang et al. 2010).

El metabolismo de carbohidratos en frutas de la familia de las cucurbitáceas ha sido ampliamente estudiado y dilucidado a lo largo del tiempo, no obstante han sido en recientes como el de Dai et al. (2010) donde se han identificado los múltiples miembros de las diferentes familias de genes que codifican las enzimas del metabolismo del azúcar durante el desarrollo del melón y han permitido describir el patrón de expresión del desarrollo de la ruta completa del metabolismo del azúcar basado en la secuenciación profunda de la expresión génica.

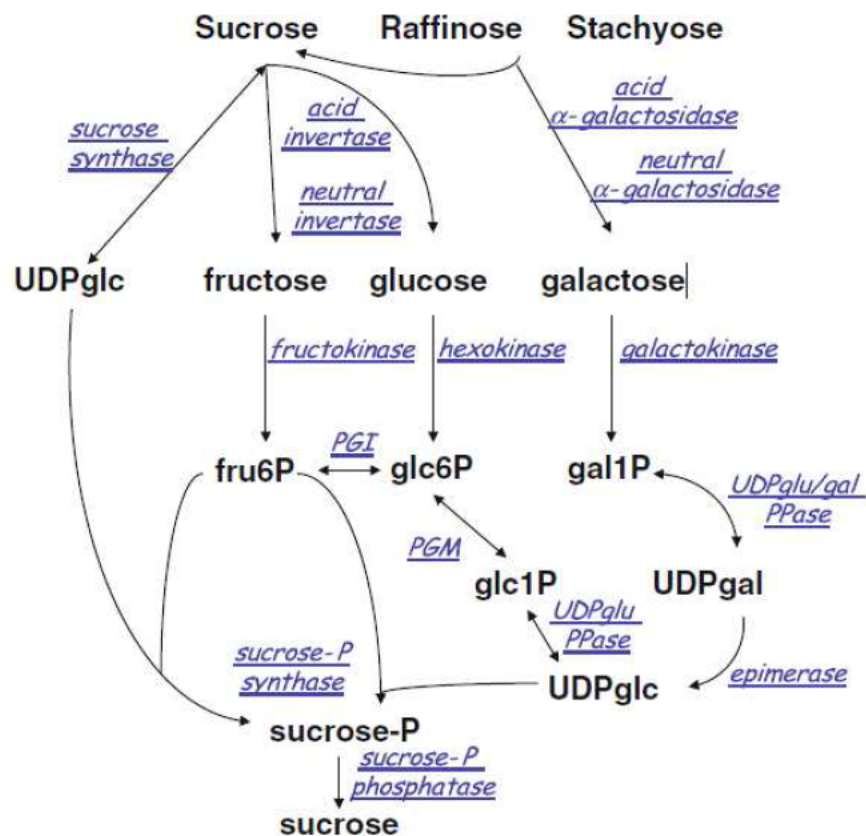


Figura 8. Ruta metabólica del metabolismo de los azúcares en frutos de melón indicando sus correspondientes reacciones enzimática (Dai et al. 2010).

1.2.2 Ácidos orgánicos.

Hay dos tipos de ácidos denominados ácidos alifáticos (cadena lineal) y ácidos aromáticos. Los ácidos más abundantes en las frutas y verduras son cítrico y málico (ambos alifáticos). El contenido de ácido de frutas y verduras en general disminuye durante la maduración. Los ácidos orgánicos aromáticos se producen a concentraciones muy bajas en varias frutas y verduras, siendo la distribución de los ácidos dentro de un fruto no uniforme (Vicente et al. 2009).

Los ácidos orgánicos juegan un papel esencial durante el desarrollo del fruto como componentes implicados en la respiración y como precursores de fenoles, aminoácidos, lípidos y compuestos aromáticos, con un papel crucial en la nutrición y elaboración de alimentos. En diversos estudios se ha mostrado que la acumulación de ácido en las frutas está regulada por expresiones coordinadas de diferentes genes del metabolismo ácido y su actividad enzimática, especialmente en el ciclo de Krebs. Sin embargo, la información sobre la regulación del metabolismo ácido en el desarrollo de frutos de melón es escasa. En la relación de azúcar/ácido, los ácidos juegan un papel importante puesto que un alto contenido de ácidos reduce la calidad de la fruta, pero una moderada concentración de ácido puede resultar en una fruta más apetecible (Tang et al. 2010, 2012).

Si bien la calidad del fruto de melón está determinada principalmente por el contenido de azúcar, se trata de una especie con un gran rango de variabilidad genética y existen genotipos que acumulan altos niveles de ácido en los frutos. La variabilidad genética en el melón es única en términos de diferencia extrema en el nivel de acidez entre genotipos amargo y no amargos (Cohen et al. 2012). Los ácidos orgánicos se acumulan tanto en la corteza como en la pulpa del melón, y tienen valores de acidez relativos diferentes. En melón climatérico ‘Charentais’ se ha encontrado la independencia de la evolución de acidez de la pulpa de la acción del etileno. El contenido en ácidos orgánicos en melón es muy limitado, destacando su contenido en ácidos cítrico, málico y succínico (Dos-Santos et al. 2007; Obando-Ulloa et al. 2009a).

El ácido cítrico se acumula fundamentalmente en la corteza del melón durante su proceso de maduración. En estudios previos (Flores et al. 2002), al comparar la acumulación de este ácido en frutos climatéricos (control) y no climatéricos (obtenidos mediante transgenia con una oxidasa antisentido -ACO-), no se encontraron diferencias significativas para la acidez de la pulpa, pero sí de la corteza. Los frutos no climatéricos acumulaban mayor cantidad de ácido cítrico, con lo se deducía que el etileno actuaba como regulador de este proceso degradando este ácido. Sin embargo, dicha hipótesis no se ha confirmado en estudios con NILs de melón con distinto comportamiento fisiológico y no se puede suponer un menor contenido en ácido cítrico al melón debido a su potencial carácter climatérico y otros factores como el del tiempo de permanencia en planta deben ser tenidos en cuenta (Dos-Santos et al. 2007).

Los resultados obtenidos recientemente por Tang et al. (2012) en el melón ‘Flavor n°4’, un nuevo genotipo de melón tipo ‘Hami’ y sus parentales, demuestran que un aumento probable en el flujo a través del ciclo de Krebs contribuye a la acumulación de ácido cítrico.

En la actualidad variedades ácidas de melón con un alto contenido en ácido cítrico, están en boga en el mercado de Reino Unido, resultando de alto interés para ciertos grupos de consumidores (Lignou et al. 2013).

El estudio e identificación de QTLs relacionados con el metabolismo de los ácidos orgánicos está en auge en los últimos años. En Obando-Ulloa et al. (2009a) se ha identificado un QTL asociado al pH (pH_{qf}8.4), mientras que otro QTL en el LG VIII ha sido considerado responsable de la mayor contribución a la acidez del fruto de melón (Cohen et al. 2012). Sin embargo, aún queda mucho por avanzar en la identificación de genes candidatos involucrados en las rutas biosintéticas responsables de la acidez del melón.

1.3 Líneas casi-isogénicas de melón.

Una genoteca de NILs consiste en una serie de líneas, cada una conteniendo una introgresión homocigótica del parental donante sobre el fondo genético de parental receptor, proporcionando todas ellas una cobertura completa o prácticamente completa del genoma del parental donante. Las poblaciones de NILs han sido usadas para el estudio de diferentes aspectos de la biología como el contenido en azúcares, vitaminas y forma y tamaño de los frutos, entre otros, y son una herramienta fundamental para la investigación de cualquier rasgo o característica medible de interés (Eduardo et al. 2007).

Las líneas casi-isogénicas de melón o NILs resultan del cruzamiento entre dos parentales no climatéricos (Fig. 9), el parental coreano tipo *Conomon* ‘Shongwan Charmi’ (accesión PI 161375) que actúa como donante sobre el fondo genético del parental español tipo *Inodorus* ‘Piel de Sapo’ que actúa como receptor (Eduardo et al. 2005).

Las NILs fueron desarrolladas después de varias generaciones de retrocruzamientos y autofecundación mediante selección asistida por marcadores moleculares desarrollados previamente y con posición conocida en el mapa genético. Para ello, se generaron plantas haploides a partir del híbrido F1 polinizando con polen irradiado

gamma, posterior rescate in vitro de embriones, multiplicación in vitro de las plantas rescatadas, estudio del nivel de ploidía de las plantas por citometría de flujo, y diploidización mediante tratamiento in vitro con colchicina para la obtención de individuos doble-haploides (DHL) (Gonzalo et al. 2011; Monforte et al. 2004). Treinta DHLs se seleccionaron y se retrocruzaron con PS para obtener una población de 30 BC1. La misma se retrocruzó de nuevo con PS para obtener 12 familias BC2. A su vez esta BC2 se cruzó de nuevo con PS (Gonzalo et al. 2005).

De manera que la mayoría de las NILs contienen una única introgresión homocigótica del parental SC, en el grupo de ligamiento III de parental PS. Intencionalmente, las genotecas con introgresiones en el conjunto de NILs tienen un alto porcentaje (en su mayor parte superior al 95%) del genoma del parental recurrente, cubriendo la mayoría del genoma de SC (Eduardo et al. 2005, 2007; Fernández-Trujillo et al. 2008; Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009ab).

La distancia genética entre PS y SC es una de las mayores distancias descritas en germoplasma de melón (Eduardo et al. 2005). Los frutos de PS son largos y ovalados, de pulpa blanca, piel de color verde con manchas dispersas y con un alto contenido en azúcar (Eduardo et al. 2007). Los frutos de SC son piriformes, de pulpa verdosa y un bajo contenido de azúcar (Monforte et al. 2004).



Figura 9. Parentales no climatéricos de las NILs de melón de la campaña 2009. a) ‘Piel de Sapo’ (PS). b) ‘Shongwan Charmi’ (SC).

1.4 Marcadores moleculares y quantitative trait loci.

La elaboración de mapas genéticos permite el uso de la selección asistida por marcadores (MAS). Se pueden utilizar marcadores estrechamente ligados a los genes o QTLs de interés en horticultura tales como resistencia a enfermedades, calidad de la

fruta o de la biología floral. Uno de los principales problemas en MAS es el evento de recombinación entre el gen y el marcador. Los marcadores deben desarrollarse en diferentes fondos de material genético de elite. Cuando un gen ha sido clonado, secuencias polimórficas entre los alelos permiten definir marcadores dentro del alelo (Pitrat 2008).

La contribución de cada gen en el control de rasgos de interés puede ser cuantitativamente estimada por un método de mapeo de quantitative trait loci (QTL) (Longhi et al. 2012). Los QTLs son, por definición, genes que alteran significativamente la molécula objetivo. Si bien el gen responsable es el objetivo, un adecuado marcador ligado a ese gen es potencialmente valioso para propuestas de producción. Un requisito previo necesario para el descubrimiento de QTLs es la existencia de variación genética sustancial en el objetivo que se busca dentro del germoplasma disponible. En la composición aromática, por ejemplo el contenido de los principales volátiles puede diferir en varios órdenes de magnitud, en muchas frutas, sobre todo fresa y melón (Klee 2010).

El desarrollo de mapas saturados de marcadores moleculares ha permitido el análisis exhaustivo de QTLs en diferentes poblaciones y el desarrollo de poblaciones adecuadas para el análisis de QTLs, como son las líneas introgresionadas y las NILs (Eduardo et al. 2007). El melón es la especie más avanzada en genómica entre las cucurbitáceas y se puede utilizar como un modelo para la familia (Pitrat et al. 2008).

Más de 160 genes cualitativos de melón han sido identificados según la lista de genes de melón 2011 (Dogimont et al. 2011). Los mapas moleculares de melón se han utilizado ampliamente para mapear QTLs asociados a parámetros de calidad del melón como el contenido en de sólidos solubles totales, ácidos orgánicos, azúcares, el peso y forma de los frutos, el color de la pulpa y del fruto entero, la maduración del fruto, la resistencia a los daños por frío, la longitud y anchura del ovario y el rendimiento o la producción de compuestos volátiles. También se han identificado QTLs para resistencia a virus, hongos y enfermedades. Esto indica que el uso marcadores moleculares y la información proporcionada por su mapeo podría ser una poderosa herramienta mediante la selección asistida por marcadores para la mejora del cultivo del melón (Fernandez-Trujillo et al. 2008; Harel-Beja et al. 2010; Obando-Ulloa et al. 2008; Park et al. 2009).

1.5 Etileno y tasa respiratoria.

El etileno (C_2H_4) es una molécula muy simple con dos átomos de carbono unidos mediante un doble enlace, y que se encuentra naturalmente en forma gaseosa. Los primeros indicios acerca de un compuesto gaseoso que afectaba a los tejidos de las plantas datan del siglo XIX, cuando se observó que las farolas de gas que se empleaban para la iluminación de las calles, causaban la senescencia y defoliación en los árboles vecinos. Es ya en el siglo XX (1901), cuando Neljubov identificó el etileno como agente causal de este efecto, y es reconocido como el descubridor de esta hormona vegetal (Martínez-Romero et al. 2007).

El etileno es una hormona vegetal importante conocida por regular múltiples procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas, y participar en las respuestas frente a estreses bióticos y abióticos, que incluyen la vida útil, almacenamiento y calidad de las frutas y hortalizas, y el desarrollo de enfermedades. Entre las acciones del etileno, se pueden citar la estimulación de la germinación de semillas latentes y de la floración, cambios en la dirección del crecimiento de las plántulas para superar algunos obstáculos en el suelo, y su importancia en la maduración de los frutos, abscisión de los órganos y crecimiento de transición entre la fase vegetativa a la fase reproductiva. Los mecanismos por los que la señal del etileno es percibida y transducida para mediar las respuestas fenotípicas no se entienden completamente (Reid 2007; Zheng y Wolff, 2000; Ezura y Owino, 2008).

La biosíntesis y percepción de etileno regula la expresión de los genes que producen los eventos típicos de maduración antes de la senescencia o etapa final del desarrollo del fruto. Estos cambios reducen la vida útil de frutas y afecta a diferentes frutas características de calidad (Obando-Ulloa et al. 2009b).

El papel regulador del etileno en la maduración se conoce desde hace más de cincuenta años e incluye su mediación en la síntesis de etileno, en su percepción por las células diana a través de receptores del etileno (ETRs), en la señal transducción en cascada en la que participan reguladores tanto positivos como negativos (CTR, EIN2, EIN3, etc), y finalmente en la regulación de la expresión de genes diana por factores de transcripción como factores de respuesta de etileno (FERs) (Bapat et al. 2010).

La ruta de biosíntesis del etileno está bien establecida y se inicia a partir del aminoácido metionina, y su conversión vía S-adenosilmetionina (SAM) mediante la adición de la adenina y el consumo de adenosin trifosfato (ATP). La SAM se transforma

a ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), con la generación del subproducto 5-metiltioadenosina (MTA), que se recicla a metionina (Met). Así, el etileno se puede producir con una altas tasa, e incluso con una pequeña cantidad de metionina libre. Finalmente, (ACC) se oxida hasta etileno. Las dos enzimas clave implicadas en el proceso son ACC sintasa (ACS) y ACC oxidasa (ACO), catalizando la conversión de SAM a ACC y del ACC a etileno, respectivamente. El inicio de la producción de etileno en la maduración climática de las frutas se asocia con el aumento correspondiente en ambas enzimas. La clonación y caracterización parcial de miembros de la las familias de genes de ACS y ACO indican que los miembros de la familia de genes son regulados diferencialmente durante la maduración de la fruta. La familia de genes de ACS es más amplia que la familia de ACO (Lelievre et al. 1997; Martínez-Romero et al. 2007; Zheng y Wolff, 2000). Hasta la fecha cinco genes de ACC sintasa y tres genes de ACC oxidasa se han aislado a partir del fruto de melón (Ezura y Owino, 2008).

La supresión de la producción de etileno por bloqueo de la a expresión de la ACS y ACO se traduce en una fuerte inhibición del proceso de maduración. Frutos de melón con supresión del etileno, no muestran aumento en el climaterio respiratorio. Sin embargo, a pesar de la ausencia de etileno. Sin embargo, a pesar de la ausencia de etileno, la acumulación de ACC y la actividad de ACC sintasa empieza a aumentar al mismo tiempo que en frutos silvestres, lo que indica que el inicio de la subida climática en el etileno y la respiración no es controlada por el etileno (Pech et al. 2008a).

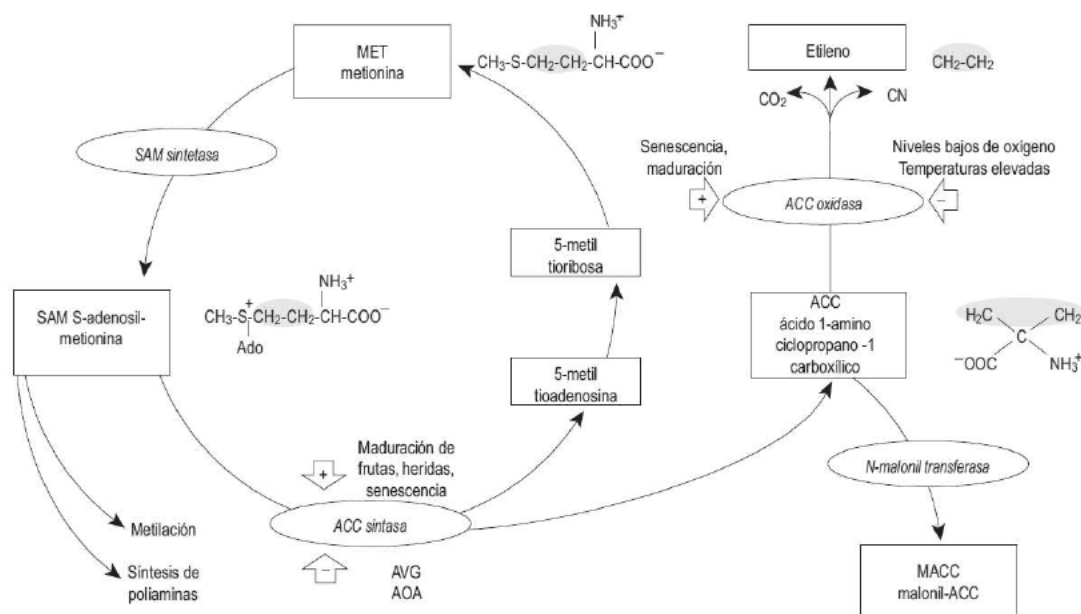


Figura 10. Ruta metabólica simplificada de la biosíntesis del etileno (Reid 2007).

El papel del etileno en los procesos madurativos de frutos climatéricos ha sido ampliamente estudiado (Flores et al. 2001b) y aunque la ruta de biosíntesis de etileno es bien conocida (Yang y Hoffman, 1984) el proceso de regulación del período climatérico de etileno durante el desarrollo y maduración de la fruta es muy complejo (Zheng et al. 2002). Estudios genómicos han revelado que una gran proporción de los genes relacionados con la maduración (aproximadamente el 40%) dependen de etileno (Page et al. 2008).

La vida útil de las frutas frescas es un parámetro de calidad de gran importancia para los consumidores, y en frutas como el melón la producción alta de etileno se ha relacionado con una duración reducida de vida comercial poscosecha (Obando et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009bc).

Desde el punto de vista de la agricultura, el etileno confiere tanto efectos positivos como negativos durante la maduración de las frutas. Entre los efectos positivos, el etileno estimula la maduración en frutas climatéricas (como la manzana, albaricoque, o plátano entre otros), lo que resulta en unas buenas características de calidad con el desarrollo sabores y aromas agradables y un color y textura adecuados. En este tipo de frutos, los efectos negativos serían una aceleración de la maduración poscosecha, y reducción de la vida útil de los frutos. En fruta no climatérica (como cítricos, la berenjena, uva, pimienta, y fresa), si bien no se requiere del etileno para la finalización de la maduración de estos frutos, su presencia aumenta la susceptibilidad frente a patógenos, alteraciones fisiológicas, y senescencia, con una reducción neta de la calidad y vida poscosecha (Martínez-Romero et al. 2007).

Durante los procesos madurativos de los frutos coexisten procesos dependientes, independientes, o solo parcialmente dependientes de la acción del etileno (Flores et al. 2001ab). En melón hay factores como el peso y tamaño de los frutos, el número de semillas, el tamaño del mesocarpo y el contenido de carotenoides en la pulpa que son independientes de la acción del etileno (Ezura y Owino, 2008). La acumulación de azúcares en la pulpa, especialmente sacarosa, durante a maduración es independiente de la acción del etileno, pero enzimas involucradas en este fenómeno como la PG o la B-Gal son dependientes de la acción del etileno (Jones et al. 2001; Pech et al. 2002), y se ha demostrado que la acumulación de sacarosa en la corteza de melones puede ser inhibida por la acción de la oxidasa antisentido (ACO), lo que sugiere una influencia del etileno (Flores et al. 2001a). Como los azúcares, los ácidos orgánicos se acumulan tanto

en la corteza como en la pulpa del melón y tienen valores de acidez relativos diferentes. Si bien estudios anteriores (Guis et al. 1997) hablan de la independencia de la acumulación de ácidos orgánicos de la acción del etileno, otros resultados indican que una parte del metabolismo de los ácidos orgánicos está relacionado con el etileno (Jones et al. 2001; Flores et al. 2001b). A su vez existen parámetros como el ablandamiento de la pulpa de melón o la producción de compuestos volátiles, con procesos tanto dependientes como independientes de la acción del etileno (Shalit et al. 2001; Flores et al. 2001a). El papel de etileno en la generación de compuestos volátiles, responsables del aroma característico de melón, es de vital importancia con procesos etileno-dependientes, como la formación de ésteres, mientras que el último paso de acetilación de alcoholes presenta componentes tanto dependientes como independientes de la acción del etileno (Pech et al. 2002; Flores, et al. 2002).

1.5.1 Comportamiento fisiológico. Frutos climatéricos vs. no climatéricos.

En relación a la fisiología de frutas y hortalizas, la importancia de la respiración se puede juzgar por el hecho de que el potencial de vida útil de los tejidos de la planta o parte de planta después de la cosecha se ha demostrado estar estrechamente relacionada con su tasa de respiración o producción de dióxido de carbono (CO₂). Del mismo modo, existe una correlación entre el nivel de etileno producido por la fruta y su tiempo de conservación y el deterioro poscosecha. Diversos estudios han demostrado que niveles bajos de O₂ y altos de CO₂ en el microambiente de la fruta puede retrasar el inicio de la subida de etileno y respiración y por lo tanto la maduración de la fruta (Vijay et al. 2012).

En la biosíntesis de etileno se distinguen dos sistemas: El sistema 1, corresponde a etileno basal o una baja producción de etileno en el período pre-climaterio de frutas climatéricas, y está presente en todo el desarrollo y la maduración de la fruta no climatérica. El sistema 2, se refiere a una producción masiva auto-estimulada de etileno, llamado “síntesis autocatalítica” y es específica de frutas climatéricas (Bapat et al. 2010). Por tanto, en función de una subida aguda o no en la biosíntesis del etileno durante la maduración, se puede hablar tradicionalmente de frutos climatéricos o no climatéricos (Lelièvre et al. 2000). Una definición más compleja habla de climaterio cuando la maduración del fruto se caracteriza por un incremento de la tasa respiratoria iniciada por una producción autocatalítica de etileno. La maduración no climatérica está

determinada por una disminución continua de la respiración, de los niveles de etileno y ausencia del pico de etileno, característico de frutos climatéricos (Moreno et al. 2008). Este es un concepto fundamental en cualquier discusión acerca del etileno en los sistemas poscosecha, sin embargo la clasificación de los frutos en ambas categorías representa una simplificación, ya que existen especies, entre ellas el melón, en que ambos sistemas pueden ser encontrados. Mientras que los frutos no climatérico tendrían respuestas relacionadas con la maduración (o no) frente al etileno exógeno, un mecanismo autocatalítico de regulación de la maduración estaría presente en los frutos climatéricos (Obando et al. 2007). La coexistencia de variedades de melón con maduración climatérica y no climatérica, hacen de esta especie un sistema adecuado para estudiar el control genético de la maduración climatérica (Moreno et al. 2008).

Tabla 8. Frutas clasificadas de acuerdo a su comportamiento respiratorio durante la maduración.

Frutas Climatéricas		Frutas No Climatéricas	
Manzana	Melones	Zarzamora	Litchi
Albaricoque	Nectarina	Cacao	Ocra
Aguacate	Papaya	Carambola	Aceituna
Plátano	Maracuyá	Nuez de la India	Naranja
Biribá	Melocotón	Cereza	Chícharo
Arándano azul	Pera	Arándano agrio	Chile pimienta
Fruto del árbol de pan	Persimonia	Pepino	Piña
Chirimoya	Plátano macho	Dátil	Granada
Durián	Ciruela	Berenjena	Tuna
Feijoa	Membrillo	Uva	Frambuesa
Higo	Rambután	Toronja	Fresa
Guayaba	Chicozapote	Jujuba	Calabacita
Jaca	Zapote	Limón	Tomate de árbol
Kiwi	Guanabana	Limón Mexicano	Tangerina y mandarina
Mango	Anona	Longan	Sandía
Mangostán	Jitomate	Níspero	

Fuente: Kader 2007.

Los frutos climatéricos pueden continuar madurando una vez separados de la planta madre, a diferencia de los frutos no climatéricos que no son capaces de continuar su proceso de maduración o lo hacen muy lentamente, una vez que se desprenden de la planta madre (incluso si la fruta ha completado el crecimiento en tamaño). Además, estos frutos producen una cantidad muy pequeña de etileno endógeno, y no responde al tratamiento con etileno externo (Prasanna et al. 2007; Vijay et al. 2012). En frutos

climatéricos, la senescencia se alcanza antes que en frutos no climatéricos (Obando-Ulloa et al., 2009).

Los tejidos vegetativos y los frutos en crecimiento sintetizan pequeñas cantidades de etileno ($0,1-0,2 \mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), que aumenta considerablemente (hasta 1000 veces) con el proceso de maduración de las frutas climatéricas (Mártinez-Romero et al. 2007).

Tabla 9. Productos hortofrutícolas y ornamentales clasificados de acuerdo a su producción de etileno (C_2H_4) ($\mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) a 20°C .

Producto	Clase	Producción C_2H_4 ($\mu\text{l}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
Alcachofa, espárrago, coliflor, cereza, frutos cítricos, uva, jujuba, fresa, granada, toronja, hortalizas de hoja, hortalizas de raíz, papa, la mayoría de flores cortadas.	Muy baja	< 0,1
Zarzamora, arándano azul, melón casaba, melón, arándano agrio, pepino, berenjena, oca, aceituna, chile (pimiento picante), persimonia, piña, calabaza, frambuesa, tomate de árbol, sandía.	Baja	0,1 – 1,0
Plátano, higo, guayaba, melón Honeydew, lichi, mango, plátano macho, jitomate.	Moderada	1,0 – 10,0
Manzana, albaricoque, aguacate, melón cantaloupe, feijoa, kiwi (maduro), nectarina, papaya, melocotón, pera, ciruela.	Alta	10,0 – 100,0
Chirimoya, zapote mamey, maracuyá, zapote.	Muy alta	> 100,0

Fuente: Kader 2007.

El mecanismo de regulación de la maduración por el etileno varía incluso entre frutos climatéricos. En frutos de tomate tratados con 1-metilciclopropeno (1-MCP) en una etapa temprana de la maduración, disminuye la producción de etileno, aunque se mantiene a un nivel considerable. En cambio, en frutos de melocotón y plátano, no se observa una reducción de la maduración relacionada con etileno en frutos tratados con 1-MCP, cuando se aplica en el grado de madurez (Hiwasa et al. 2003).

En melón, la tasa de producción de etileno varía en función de sus diferentes genotipos. En melones de pulpa anaranjada de la variedad *cantalupensis*, se ha descrito una explosión en la producción de etileno, que coincide con la madurez del fruto y la abscisión. Por el contrario, en melones de pulpa verde y blanca *Honeydew* y otras

variedades de larga vida útil (*inodorus*) la producción de etileno es menor, y por lo general no forman una zona abscisión en la madurez comercial (Ezura et al. 2008).

El tratamiento de melones antisentido ACO con etileno, ha permitido la recuperación completa de la maduración y la determinación de la sensibilidad gradual de varias vías de la hormona. El nivel umbral de etileno capaz de actividad fisiológica varía desde $1 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ del desverdizado de la corteza, a $2,5 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ para el ablandamiento de la pulpa, deterioro de la membrana y para la separación celular en la zona del pedúnculo. Los niveles de saturación para el cumplimiento total de la vía son $2,5\text{-}5,0 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$, valores mucho más bajo que el etileno interno encontrado en el pico climatérico (más de $100 \mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que indica que el fruto desarrolla más de etileno de lo necesario (Pech et al. 2008a).

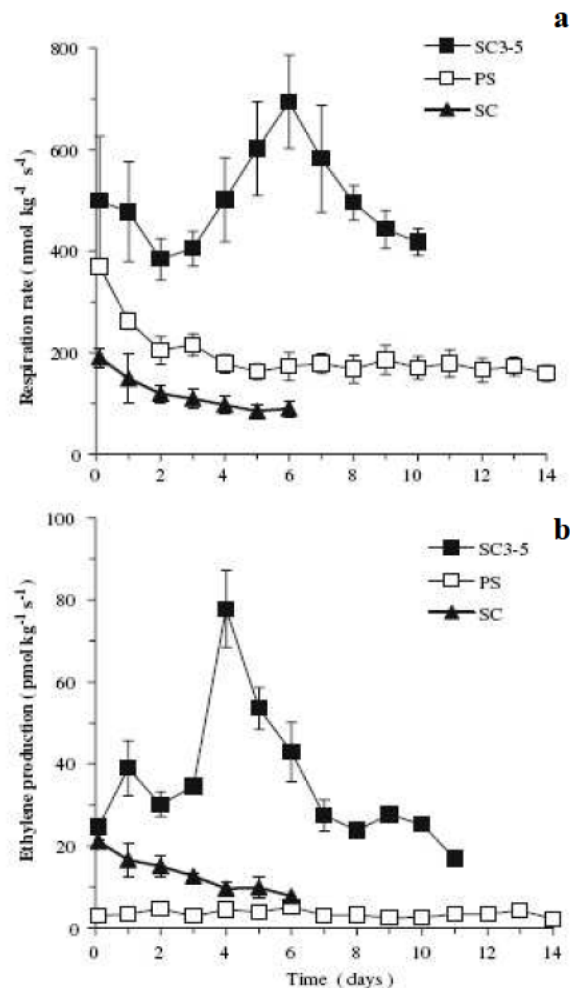


Figura 11. a) Tasa respiratoria ($\text{nmol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ de CO_2 y b) etileno endógeno ($\text{pmol}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ de etileno medidos a 21°C en distintos frutos de melón de los parentales no climatéricos PS, SC y la NIL climatérica (SC3-5) (Moreno et al. 2008).

Numerosos estudios llevados a cabo en de melones transgénicos portadores de la oxidasa antisentido ACO (Flores et al. 2001b; Shiomi et al. 1999; Yamamoto et al. 1995) que actúa bloqueando la síntesis de etileno hasta en un 99,5% (Ayub et al. 1996), han demostrado que una parte de los procesos madurativos de frutos climatéricos están regulados por mecanismos independientes de la acción del etileno mientras que otros son total o parcialmente etileno-dependientes (Jones et al. 2001; Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009b). Las vías de maduración dependientes e independientes del etileno han sido estudiadas en melón tipo-silvestre y en melón transgénico (AS3), con una inhibición extrema del etileno. Los frutos transgénicos se caracterizaron por ser más firmes y mostrar mayores niveles de clorofila y de acidez en comparación con los silvestres, en cambio no hubo cambios en el contenido de carotenoides en ambos tipos de melones (Bapat et al. 2010).

El conocimiento actual del etileno y los procesos madurativos de frutas y hortalizas, apunta claramente a la coexistencia de vías independientes y dependientes del etileno, en ambas categorías de frutos (climatéricos y no climatéricos). La variabilidad en la morfología de la superficie y en las características anatómicas de los frutos puede proporcionar una explicación adicional para las variaciones existentes en el comportamiento de la maduración, no sólo entre diferentes tipos de frutas, sino también entre los diferentes cultivares de un fruto, al variar las concentraciones endógenas de O₂, CO₂ y etileno (Vijay et al. 2012).

En la actualidad se conoce bastante acerca del papel del etileno en la maduración de frutas y hortalizas, sin embargo, las interrogantes por resolver aún siguen siendo numerosas. Nos encontramos ante un complejo campo de investigación en el que hay que continuar avanzando aprovechando las poderosas herramientas disponibles actualmente, como el mapeo genético de QTLs y/o las herramientas de bioinformática que nos ayudarán a dar un salto cualitativo y cuantitativo en la consecución de este objetivo común a muchos investigadores.

2. COMPUESTOS VOLÁTILES

2. COMPUESTOS VOLÁTILES

2.1 Compuestos volátiles. Generalidades.

El sabor o “flavor” es una combinación de aromas, gusto y sensación en boca como resultado de un equilibrio entre un gran conjunto de metabolitos primarios y secundarios de azúcares, ácidos orgánicos, compuestos volátiles y aminoácidos libres. La percepción humana del sabor implica la integración de una cantidad masiva de información cuantitativa a partir de múltiples sistemas sensoriales. Los seres humanos tienen 350 genes de receptores olfativos y son estos receptores los que proporcionan la diversidad de sabores que experimentamos (Klee 2010; Gao et al. 2007).

Los compuestos responsables del sabor se forman generalmente durante la maduración de las frutas cuando el metabolismo cambia radicalmente y se inicia el catabolismo de las moléculas de alto peso molecular tales como las proteínas, polisacáridos, lípidos y se degradan y se convierten en metabolitos volátiles (Aharoni y Lewinsohn, 2010).

El aroma de la fruta, uno de los parámetros que más influyen en las preferencias del consumidor, es una compleja mezcla de una amplia gama de compuestos con diferentes grados de volatilidad. Una importante contribución al olor característico de la fruta y a la percepción de su calidad general depende de los ésteres y en cierta medida de los compuestos azufrados (Bauchot et al. 1998; Luchetta et al. 2007; Verzera et al. 2010). En frutos de melón, el aroma, provocado por la liberación de volátiles, es un factor esencial de calidad fuertemente vinculado al proceso de maduración y controlado genéticamente (Gao et al. 2007; Nuñez-Paleniús et al. 2008).

Solo en el reino vegetal se ha identificado varios miles de compuestos volátiles en los tejidos florales, vegetales y de las la frutas, y estos compuestos comprenden un 1% de los metabolitos de plantas e incluyen terpenoides, fenilpropanoides, bencenoides, y derivados de ácidos grasos y aminoácidos (Skogerson et al. 2011)

Las clases más importantes de aromas son compuestos derivados de monoterpenos, sesquiterpenos, lípidos, azúcares y aminoácidos y cada producto se caracteriza por un aroma distinto en función de la proporción de volátiles clave y la presencia o ausencia de componentes exclusivos (Pech et al. 2008b). Por ejemplo, en tomate aunque se han identificado más de 400 compuestos volátiles sólo 30 están presentes a concentraciones suficientes para afectar al aroma (Gao et al. 2007). Por lo tanto, las estrategias

desarrolladas para mejorar el aroma de los volátiles emitidos por las frutas y hortalizas incluyen una amplia gama de objetivos que comprende las diferentes vías metabólicas, los elementos reguladores, como las hormonas, los factores de transcripción y los mecanismos que intervienen en el almacenamiento o el secuestro de los precursores volátiles, tales como la glicosilación y almacenamiento en las vacuolas (Pech et al. 2008b).

La presencia y abundancia de compuestos volátiles en la frutas depende de muchos factores como la variedad, las prácticas culturales, la madurez y el manejo poscosecha. De todos estos factores, la madurez desempeña un papel crítico en el desarrollo de compuestos volátiles. Los frutos deben cosecharse en el momento óptimo de maduración si que quiere obtener una buena relación entre desarrollo de aromas, sabor y madurez (Song y Forney, 2007).

Existe un interés creciente por conocer los marcadores moleculares asociados a atributos de calidad del melón (entre ellos los relacionados con los aromas y el gusto del melón) e identificar los QTL asociados al climaterio y la producción de etileno que están directamente relacionados con la vida comercial del fruto (Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008).

2.2 Síntesis de compuestos volátiles y principales enzimas implicadas.

Los compuestos volátiles metabolizados en aromas son diversos (ácidos grasos, aminoácidos, fenoles y terpenos entre otros) y siguen diferentes vías bioquímicas como la vía de la β -oxidación, la vía de los isoprenoides o terpenos, la vía del ácido siquímico, la vía de la fermentación, entre otras (Fig. 1). Los volátiles se pueden clasificar como metabolitos “primarios” o “secundarios” según se formen de manera natural por la acción enzimática sobre tejido intacto o bien sobre tejido dañado, respectivamente (Li et al. 2006; Song y Forney, 2007; Obando-Ulloa et al. 2010).

- Los ácidos grasos (AGs), fundamentalmente de los lípidos de membrana, son importantes precursores de los compuestos volátiles que participan en el aroma de las frutas y verduras. Entre los volátiles derivados de los ácidos grasos insaturados y saturados se incluyen alcoholes de cadena corta, aldehídos, cetonas, lactonas, ácidos y ésteres generados básicamente por tres procesos; α -

oxidación, β -oxidación y por la vía de la lipooxigenasa (LOX) (Pech et al. 2008b; Schwab et al. 2008).

- Del metabolismo de los aminoácidos (AA) se generan compuestos como alcoholes, aldehídos, carbonilos, ácidos y ésteres, que contribuyen en gran medida y en algunos casos determinan, el aroma primario de muchas frutas. La reserva de estos aminoácidos libres de la fruta podría determinar su perfil de aroma. Tres actividades enzimáticas: aminotransferasa, descarboxilasa y la alcohol, deshidrogenasa (ADH), intervienen en la síntesis de aromas a partir de aminoácidos. A pesar de la importancia de la ADH para la biosíntesis de aromas en la fruta, en la mayoría de las frutas la especificidad de la ADH no es un factor limitante, mientras que el paso de la descarboxilación, parece ser crítico para la liberación de los precursores de los ésteres (Pech et al. 2008b; Pérez y Sanz, 2008).
- Los terpenos volátiles provienen directamente del metabolismo de los hidratos de carbono y pertenecen a una gran familia de compuestos naturales conocidos como isoprenoides. La ruta biosintética de los isoprenoides genera tanto metabolitos primarios como secundarios. Entre los primeros se encuentran el ácido giberélico y abscísico, clorofilas y carotenoides y otros compuestos importantes como ubiquinonas o esteroides. Entre los que se consideran metabolitos secundarios están los terpenoides volátiles. Los terpenos procedentes de la ruta biosintética del ácido mevalónico y del metileritritol 4-fosfato (MEP). Los monoterpenos son el principal componente del aroma de las frutas de la familia de isoprenoides, que junto con diterpenos y tetraterpenos, proceden de la vía MEP (Pérez y Sanz, 2008). Los terpenos, sesquiterpenos y triterpenos proceden de la vía del ácido mevalónico a partir de los precursores difosfato prenil por la acción de las enzimas terpeno sintasas de cuya acción derivan directamente la mayoría de los terpenos volátiles, mientras que otros se transforman en compuestos hidroxilados, deshidrogenados o acetilados (Pech et al. 2008b). Entre los terpenoides se encuentran los pigmentos carotenoides que se acumulan en los plastidios de las hojas, flores y frutas, donde contribuyen a la coloración roja, naranja y amarilla. Las dioxigenasas carotenoides catalizan la rotura oxidativa de los carotenoides, lo que resulta en la producción de

apocarotenoides, tales como β -ionona, importantes compuestos aromáticos que poseen bajos umbrales aromáticos. Se han encontrado dioxigenasas que participan en la formación de compuestos aromáticos importantes en el melón (*Cucumis melo* L.) (Aharoni y Lewinsohn, 2010; Schwab et al. 2008).

- Del metabolismo de los azúcares, principalmente de la D-fructosa-1,6-difosfato, se derivan estructuras de furanona como el furaneol (2,5-dimetil-4-hidroxil-3(2H)-furanona) y sus derivados metoxi, presentes en grandes concentraciones en el aroma de las fresas (Pech et al. 2008b; Song y Forney, 2007). El furaneol imparte notas de azúcar caramelizado a altas concentraciones y notas afrutadas cuando está a más bajas concentraciones. El furaneol es el compuesto más importante entre las furanonas debido a su bajo umbral aromático (Pérez y Sanz, 2008).
- Los compuestos derivados del azufre provienen probablemente de aminoácidos azufrados, como la cisteína, cistina y metionina, de azúcares reductores y de la tiamina o vitamina B1 (Obando-Ulloa et al. 2008). Estos son compuestos responsables de olores tan característico como el olor a ajo (metanotiol), a cebolla, a patata hervida y a coliflor cocida (Schawb et al. 2008).
- Algunos volátiles muy comunes como acetaldehído o etanol que son parte de la ruta fermentativa pueden proceder del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos o aminoácidos a la misma vez (Schwab et al. 2008).

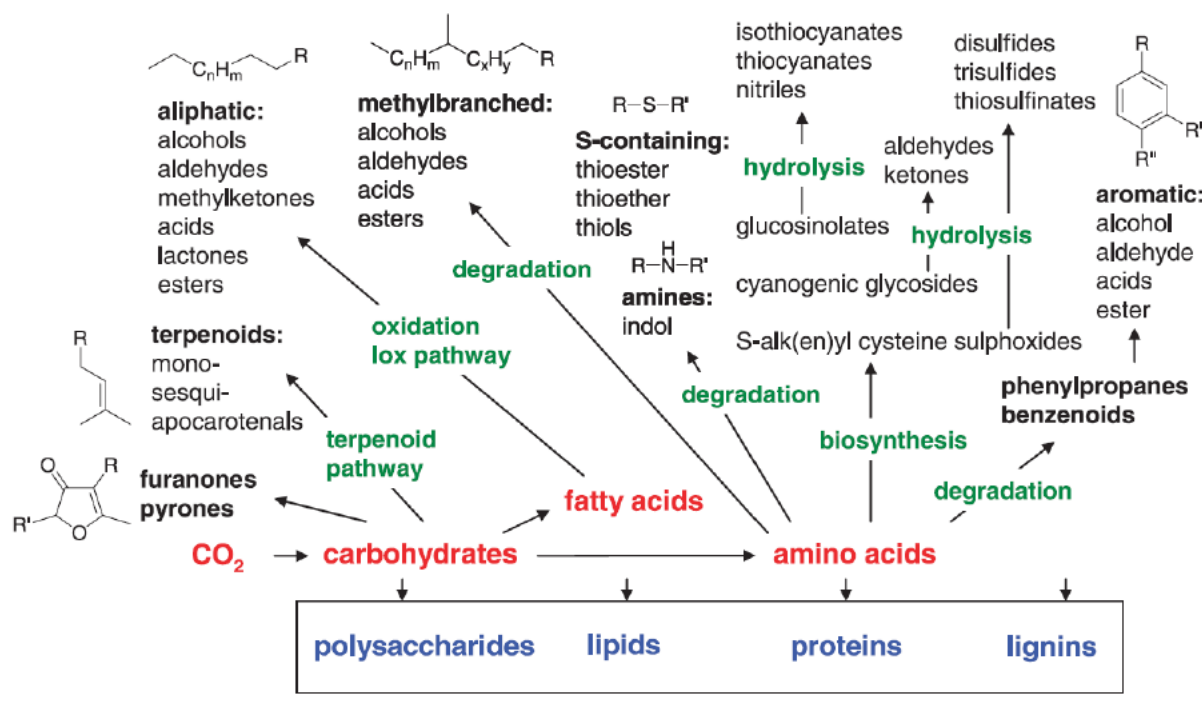


Figura 1. Sustratos y rutas metabólicas para la síntesis de compuestos volátiles (Schwab et al. 2008).

Entre las principales enzimas implicadas en la generación de compuestos volátiles se encuentran las siguientes:

2.2.1 Lipoxigenasa (LOX).

Cataliza la hidroperoxidación de ácidos grasos poliinsaturados con estructura cis, cis-pentadieno, siendo el ácido linoleico y linolénico sus principales sustratos en las plantas y los precursores de la síntesis de aldehídos a través de la vía de la LOX (Pech et al. 2008b). Aunque la mayoría de las LOXs de las plantas prefieren ácidos grasos libres como sustratos, se ha demostrado la actividad de algunas LOXs con ácidos grasos poliinsaturados esterificados en los fosfolípidos o triglicéridos. La vía LOX se reconoce como responsable de la generación de las notas aromática “verde fresco” en productos vegetales (Pérez y Sanz, 2008). Algunos genes responsables de la síntesis de los isoenzimas de la LOX pueden requerir regulación post-transcripcional por el etileno durante la maduración del fruto y la senescencia (Baldwin et al. 2000; Beaulieu y Baldwin, 2002; Obando-Ulloa et al. 2009a).

2.2.2 Fosfolipasas.

Involucradas en la formación de ácidos grasos poliinsaturados libres que se consideran generalmente como sustrato de la LOX (Pech et al. 2008b).

2.2.3 Hidroxiperoxido liasa (HPL).

Enzima que forma hemiacetales muy inestables de hidroperóxidos generados por la LOX a partir de ácidos grasos poliinsaturados, conducentes a la generación de aldehídos y enoles (de aldehídos) por disociación espontánea (Pech et al. 2008b). La escisión catalizada por la HPL tiene lugar entre el carbono que contiene el grupo hidroperóxido y el carbono etilénico próximo, dando lugar a compuestos carbonílicos de seis u nueve carbonos y los oxoácidos correspondientes. Productos obtenidos del ácido 13-hidroperoxilinoico son el hexanal y el ácido 2-oxo-(Z) dodecenoico (Pérez y Sanz, 2008).

2.2.4 Alcohol deshidrogenasa (ADH).

Interviene en la síntesis de compuestos volátiles de la fruta catalizando la interconversión de aldehídos a alcoholes y proporcionando sustratos para la formación de ésteres (Ezura y Owino, 2008; Pech et al. 2008b).

2.2.5 Alcohol acetil-transferasa (AAT).

Es la enzima clave en la bioquímica del aroma con diversos isoenzimas que participan en la ruta biosintética de aromas volátiles en la fruta por esterificación de los ésteres volátiles (Ezura y Owino, 2008). La AAT cataliza la transferencia de un acil-CoA a un alcohol y es capaz de combinar diferentes alcoholes y acil-CoA contribuyendo a la síntesis de una amplia gama de ésteres (Pech et al. 2008b; Li et al. 2006).

2.2.6 Aminoácidos precursores de compuestos volátiles.

Muchos aminoácidos son precursores de aromas, tales como leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, serina, treonina y ácido aspártico, y la mayoría de ellos están naturalmente presentes en los zumos de frutas. Los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina) son importantes en la formación de no de alcoholes de cadena ramificada o alcoholes superiores, pero también aldehídos de cadena ramificada o ácido, y, lo más importante, ésteres de cadena ramificada (Trinh et al. 2010).

Muchos de los volátiles importantes del aroma de melón derivan de los aminoácidos, siendo precursores en la síntesis de compuestos volátiles tanto en variedades aromáticas como no aromáticas de melón. En las variedades aromáticas estos volátiles son en su mayoría esterificados y sus niveles son generalmente más altos que en las variedades no aromáticas, donde estos aminoácidos conducen generalmente a la formación de aldehídos y alcoholes. Recientes estudios en melón, revelan la correlación entre un grupo de metabolitos que incluyen aminoácidos ramificados y aromáticos con volátiles o precursores de volátiles y que cuentan con la participación de enzimas aminoácido transaminasas para el catabolismo de los aminoácidos en compuestos aromáticos del melón (Bernillon et al. 2013; Gonda et al. 2011).

Los aminoácidos libres, especialmente alanina, valina, leucina, isoleucina, y metionina (Fig. 2) son los principales precursores implicados en la biosíntesis de compuestos volátiles en melón, incrementando sus valores en asociación con la producción de aromas. Estos aminoácidos suelen ser los precursores de la mayoría de los ésteres que se encuentran en frutos de melón, proporcionando la mitad de la cadena ramificada de alquilo, que está presente en una proporción significativa de los compuestos ésteres volátiles. Las síntesis de compuestos volátiles como el 2-metilbutil, 2 metilpropil, acetato de etilo y ésteres de tioeter, en frutos maduros de melón, indica una abundancia de leucina, valina, alanina y metionina libre, respectivamente. En melón tipo cantalupo (*Cucumis melo* var. *reticulatus* cv. 'Sol Real') se han identificado muchos más compuestos volátiles en los frutos maduros en comparación con frutos inmaduros, siendo los aldehídos (especialmente <C8) y cetonas, los compuestos dominantes en las muestras inmaduras, mientras que estos compuestos no fueron detectados o tan sólo lo fueron en cantidades traza en los frutos maduros (Beaulieu y Grimm, 2001; Nuñez-Paleniús et al. 2008; Song y Forney, 2007).

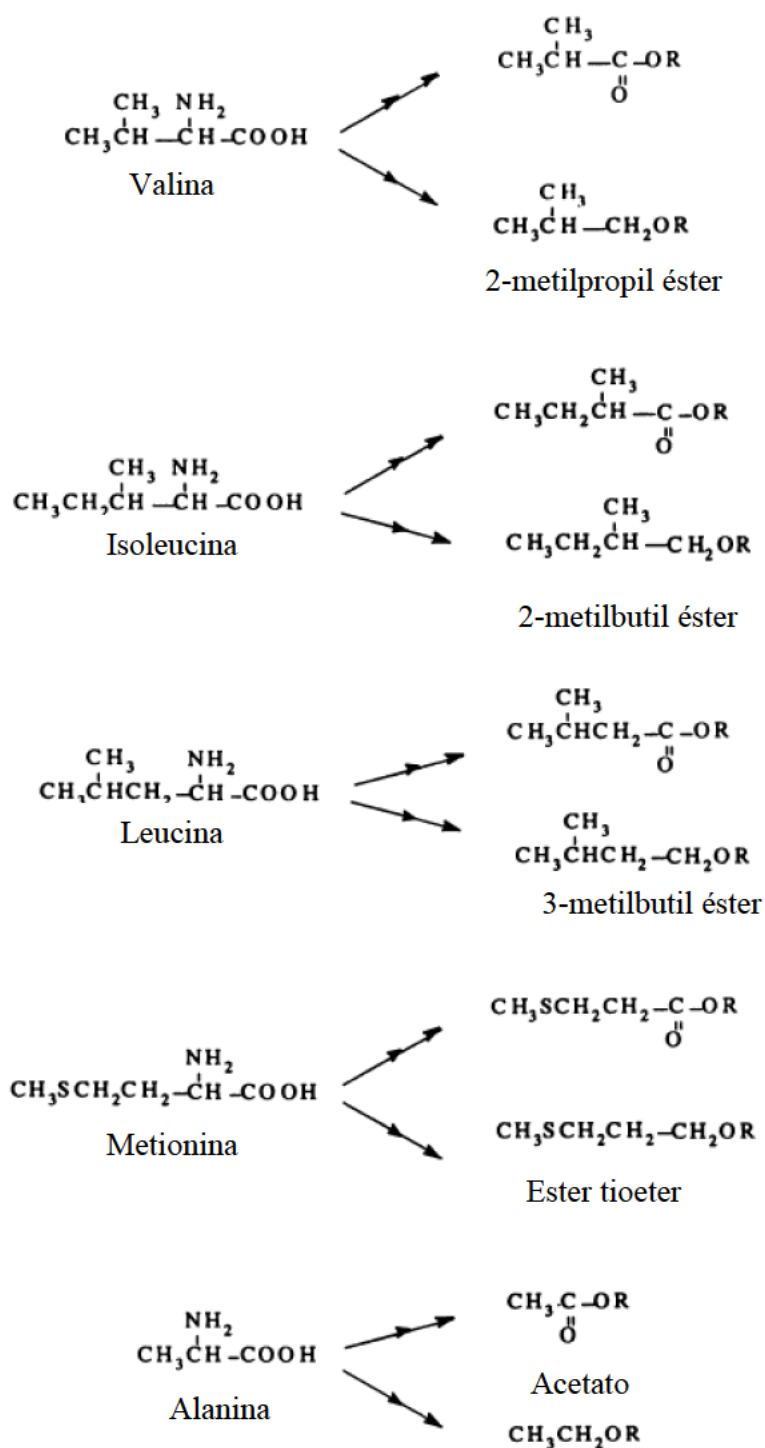


Figura 2. Rutas para la conversión de algunos aminoácidos a ésteres volátiles (Wyllie et al. 1995).

Los resultados obtenidos en frutos de melón (cv. *Makdimon*) indicaron unas concentraciones similares de leucina e isoleucina en toda la fase de maduración. Sin embargo los ésteres aromáticos formados se caracterizaron por tener esqueletos de

carbono derivados casi exclusivamente de la isoleucina. Por lo tanto, en algún momento del proceso de formación de este las enzimas implicadas mostraron una selectividad por el sustrato extraído de la reserva de aminoácidos. Esta selectividad es probable que esté determinada genéticamente y tenga una profunda influencia en el perfil de ésteres volátiles del melón, lo que explicaría en parte la variabilidad de composición de ésteres encontrada en diferentes cultivares de melón (Wang et al. 1996).

La metionina es usada también por las plantas en la síntesis del etileno. Este proceso es conocido como el ciclo de Yang o el ciclo de la metionina (Fig. 3). La metionina es un aminoácido importante para la generación de ciertos compuestos volátiles. La degradación enzimática de la metionina junto a la de la cisteína, conduce a la formación de compuestos derivados del azufre alifáticos, tales como tioles o sulfuros (Gunther et al. 2011; Varlet y Fernández, 2010).

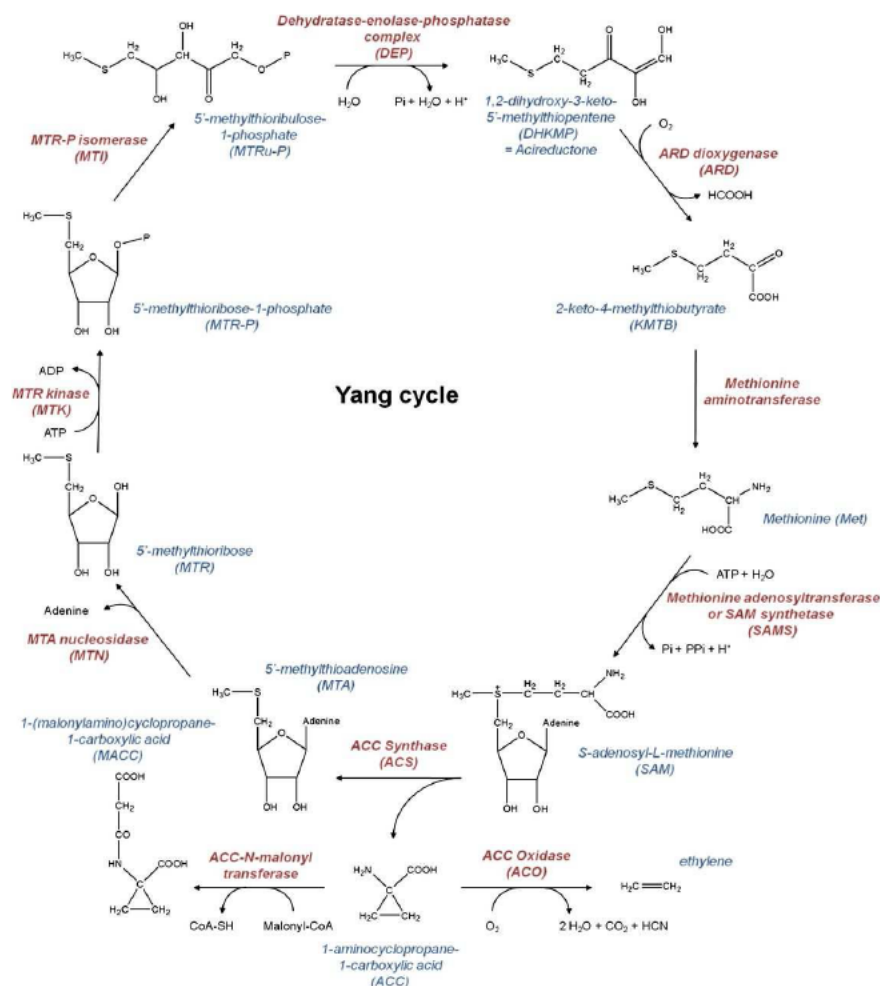


Figura 3. Representación estructural de la biosíntesis de etileno y el ciclo de la metionina o ciclo de Yang con las correspondientes enzimas implicadas (Van de Poel et al. 2012).

2.3 Principales compuestos volátiles en el perfil aromático del melón.

En general, la calidad de los frutos de melón se asocia sobre todo con un elevado nivel de azúcar y un excelente sabor en el tejido mesocárpico (Nuñez-Paleniuss et al. 2008). Los volátiles aromáticos, así como el contenido de sólidos solubles, pueden contribuir al dulzor del melón en relación con la percepción humana, y aunque los aromas de algunos de los compuestos volátiles individuales, especialmente ésteres, a menudo han sido relacionados con el sabor dulce y las notas afrutadas del melón, el aroma peculiar del melón no se puede relacionar con un único compuesto (Alsmeirat y El Assi, 2010; Shalit et al. 2001).

El aroma de melón ha sido ampliamente investigado y aunque más de 240 compuestos volátiles (sobre todo ésteres) se han identificado en variedades de melón climatérico ('Galia' y 'Cantalupo') y al menos 42 compuestos en melones no climatéricos (tipo 'Rochet', 'Piel de Sapo', 'Honeydew' o 'Casaba'), la literatura posee en proporción pocos datos cuantitativos. La inmensa mayoría de compuestos identificados en frutos de melón han sido alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, y compuestos azufrados. Entre ellos, el etil isobutirato, etil butirato y metil 2-metilbutirato aportan una gran parte del aroma afrutado. Según diversos autores, pequeñas cantidades de ciertos ésteres con contenido sulfuroso, como el 2-(metiltio) etil acetato, tienen un gran impacto en la nota aromática típica de melones, y junto con los alcoholes y compuestos carbonílicos, especialmente los que contienen una cadena de nueve carbonos, son los principales determinantes de la calidad de fruta de melón percibidos por los consumidores. Estos compuestos dependen fuertemente de la variedad y del comportamiento fisiológico, siendo los frutos climatéricos de melón de mayor intensidad aromática y menor vida comercial que los frutos no climatéricos. Se demuestra por tanto que el contenido de compuestos volátiles responsables del "aroma de melón" es muy variado y es un atributo cultivar-dependiente (Aubert y Pitrat, 2006; Li et al. 2006; Luchetta et al. 2007, Nuñez-Paleniuss et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008, 2010; Verzera et al. 2010).

El desarrollo del aroma del melón está estrechamente relacionado con los cambios metabólicos que se producen durante la maduración del fruto y representa una importante característica en la calidad general de la fruta. Sin embargo existe un conocimiento limitado de la ruta de biosíntesis de aromas (Li et al. 2006).

Los ésteres no están presentes en los frutos verdes de melón, pero a medida que éstos se aproximan a la maduración, los niveles aumentan rápidamente hasta alcanzar un 80% del total de compuestos volátiles del fruto maduro. Cuando el fruto comienza a sobremadurar el nivel de ésteres vuelve a disminuir hasta el 50-60% del total (Monforte y Álvarez, 2006).

La mayoría de los aldehídos son compuestos que están presentes a niveles altos o incrementan notablemente durante etapas de crecimiento del fruto para luego disminuir con el incremento de la madurez de la cosecha. Otros como el acetaldehído y el hexanal se han descrito como responsables del aroma agradable del melón ‘Cantaloupe’ y sus altas concentraciones están asociadas a un alto grado de madurez en el melón probablemente como resultado de la estimulación por el etileno de la actividad LOX (Obando-Ulloa et al. 2008, 2010).

Entre los diversos cultivares de melón, existen diferencias entre los compuestos considerados como importantes constituyentes de sus aromas característicos. El melón no climatérico Honeydew, se caracteriza por un aroma dulce y afrutado y tiene un alto contenido en aldehídos y alcoholes de nueve carbonos, con una fuerte asociación con los compuestos aromáticos (Z)-6-nonenal y (Z)-6-nonen-1-ol. En el melón climatérico Cantalupo, su aroma dulce, floral y afrutado se encuentra asociado a importantes cantidades de ésteres, especialmente ésteres azufrados, que pueden contribuir a las notas de almizcle en el aroma del melón, y ésteres de etilo. El cultivar climatérico tipo Galia destaca por su alto contenido en alcoholes y ésteres de metilo que le proporcionan un aroma como a pepino (Kourkoutas et al. 2006; Song y Forney, 2007).

La falta de actividad enzimática de la AAT en melones no climatéricos explicaría porque en los melones no aromáticos, apenas hay cambios en el perfil aromático a lo largo de la maduración del fruto (Monforte y Álvarez, 2006).

Algunos compuestos volátiles presentes en frutos de melón climatérico (*Cucumis melo* L. cv. Kuylin.), como acetaldehído, etanol, acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo, acetato de butilo, etil-2-metilbutirato, hexil acetato, y (Z)-3-hexenil acetato, aumentan con la maduración del fruto (Fuggate et al. 2007).

El análisis de las etapas de maduración y los periodos de almacenamiento de dos cultivares de melón climatérico ‘Charentais’ han revelado que los cambios en el

patrón de volátiles son los responsables de las diferencias en la calidad del aroma. La mayoría de los compuestos volátiles analizados estuvieron presentes en ambos cultivares, pero se detectaron diferencias en su composición y magnitud con la maduración y almacenamiento, siendo los ésteres el grupo principal (Alsmeirat y El Assi, 2010).

Durante el almacenamiento de frutos de melón, los ésteres volátiles generalmente disminuyen o exhiben un aumento transitorio antes de descender después de 5-7 días de almacenamiento. El porcentaje relativo de los ésteres de acetato disminuye durante el almacenamiento en muchos cultivares, y esta disminución suele ir acompañada por aumentos simultáneos de ésteres no acetato (Nuñez-Palén et al. 2008).

En frutos de melón ‘Hami’ (*Cucumis melo*. var. *reticulatus*.) congelados a -18°C, el tipo y concentración de ésteres disminuye, mientras que de los alcoholes insaturados y aldehídos de 6 y 9 átomos de carbono aumenta, haciéndose más intensas las notas de melón verde. Esto puede deberse a que la actividad enzimática de la LOX se mantiene alta, catalizando la conversión de los ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y linolénico) a aldehídos y alcoholes.

2.3.1 Ésteres

Los ésteres volátiles contribuyen de manera importante al aroma de las frutas, y también el sabor de los productos fermentados. Los ésteres son sintetizados a partir de alcoholes y acetilCoAs a través de la acción de AATs, que catalizan el último paso en la producción de ésteres (Fig. 4). Se ha demostrado la responsabilidad de una AAT para la acetilación de alcoholes en el melón (Yahyaoui et al. 2002). Las ADHs realizan la interconversión de aldehídos en alcoholes proporcionando así los sustratos para la formación de ésteres (Manríquez et al. 2006; Pérez y Sanz, 2008).

Los ácidos grasos (linoleico y linolénico) y los aminoácidos han sido identificados como los principales sustratos para la síntesis de ésteres, tanto acetato como no acetato (Rowan et al. 2009; Gonda et al. 2010; Dávila-Aviña et al. 2011). Existe una relación biogenética bien establecida entre la formación de aromas volátiles y los aminoácidos libres presentes en la maduración de la fruta. Los ésteres volátiles que contienen una cadena ramificada de alquilo proceden de aminoácidos, siendo la valina, isoleucina, metionina y alanina los ácidos aminados postulados como precursores de la mayoría de los ésteres que se encuentran en frutos de melón. Los ésteres alifáticos son producidos a

partir de ácidos grasos libres, tales como los ácidos linoleico y linolénico, proporcionando cadenas lineales de 2, 4 y 6 carbonos predominantemente por β -oxidación de los ácidos grasos (Youming et al. 1996; Flores et al. 2002; Li et al. 2006; Song y Forney, 2007).

En melón, los ésteres dominantes son metilbutil, etil, hexil, nonenil y bencil acetatos, butanoatos, metilpropanoatos y hexanoatos (Song y Forney, 2007).

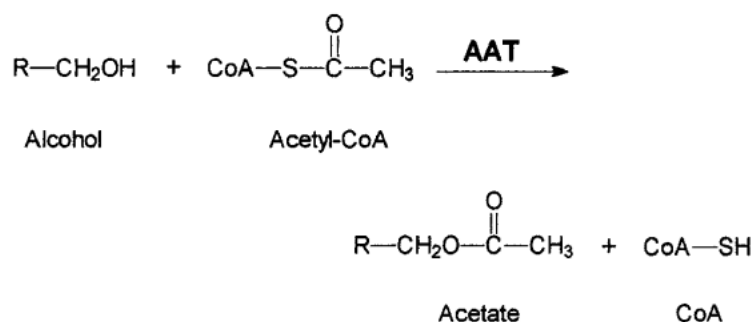


Figura 4. Formación de ésteres volátiles por acilación de alcoholes y acetil-CoA. La enzima alcohol acil-transferasa (ATT) cataliza esta reacción (Shalit et al. 2001).

Los melones climatéricos del grupo *reticulatus* se caracterizan por una actividad alta de la enzima ATT, siendo insignificante su actividad en melones no climatéricos del grupo *inodorus*. Los ésteres de azufre han sido identificados por varios autores como componentes del perfil de aromas de melón (*Cucumis melo* var. *reticulatus*). Entre estos compuestos se encuentran el etil (metiltio) acetato, etil 3-(metiltio)-propanoato y el 3-(metiltio) propil acetato como importantes contribuyentes a la percepción general del aroma de la fruta madura. El etil 3-(metiltio)-propanoato tiene una nota al aroma típico de melón (Luchetta et al. 2007).

Dos compuestos importantes identificados en el melón climatérico ‘Charentais’ han sido los acetatos de hexilo y de butilo, con las siguientes rutas biosintéticas: hexanoato→hexanol→hexanal→acetato de hexilo y la conversión de hexanoato en butirato por β -oxidación que conduce a la formación de acetato de butilo través de la ruta siguiente: butirato→butanol→butanal→acetato de butilo (Flores et al. 2002).

Una combinación de varios ésteres volátiles imparte el aroma característico de los melones, siendo el isoamilacetato y el de 2-metilbutil acetato los compuestos prominentes en muchas variedades (Schawb et al. 2008).

2.3.2 Alcoholes y aldehídos.

Otros de los compuestos importantes identificados en frutos de melón son alcoholes y aldehídos, que se producen a partir de ácidos grasos libres como el linoleico y linolénico (Figs. 5 y 6) a través de la actividad LOX, o de aminoácidos (como por ejemplo, el acetaldehído que viene de alanina), o bien por degradación enzimática de los lípidos. Los ácidos grasos pueden generar compuestos con cadenas más cortas por β -oxidación. Los aldehídos se reducen a alcoholes en una reacción catalizada por la ADH que también actúa proporcionando sustratos para la formación de ésteres.

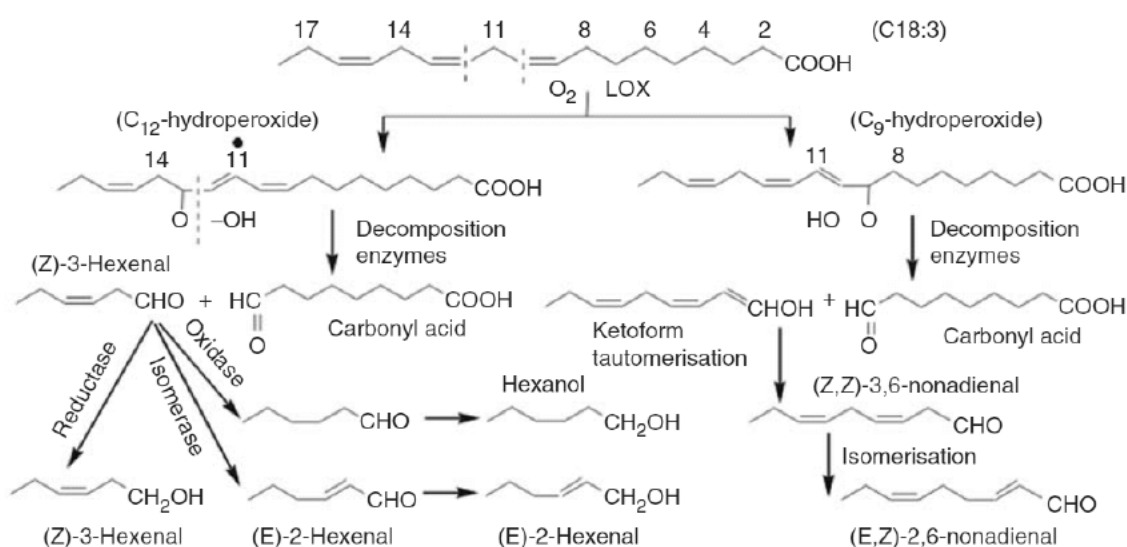


Figura 5. Ruta biosintética de alcoholes y aldehídos insaturados C6 y C9 con el ácido linolénico como precursor (Ma et al. 2007).

Algunos aldehídos de cadena corta, como el 3(Z)-nonenal, y el 3(Z)-hexenal, se obtienen de la descomposición de hemiacetales obtenidos a partir del acción enzimática de la HPL sobre hidropéroxidos de ácidos grasos. En melón, la conversión reversible de aldehídos a sus alcoholes correspondientes es controlada por el etileno y está fuertemente inhibida por el antagonista de etileno 1-metilciclopropeno y en las frutas en el que la producción de etileno ha sido suprimida por un gen antisentido de la ACC oxidasa. (Flores et al. 2002; Li et al. 2006; Manríquez et al. 2006; Obando Ulloa et al. 2008).

Los alcoholes son menos importantes como moléculas de flavor debido a su altos umbrales de olor en comparación con sus aldehídos homólogos (Schawb et al. 2008).

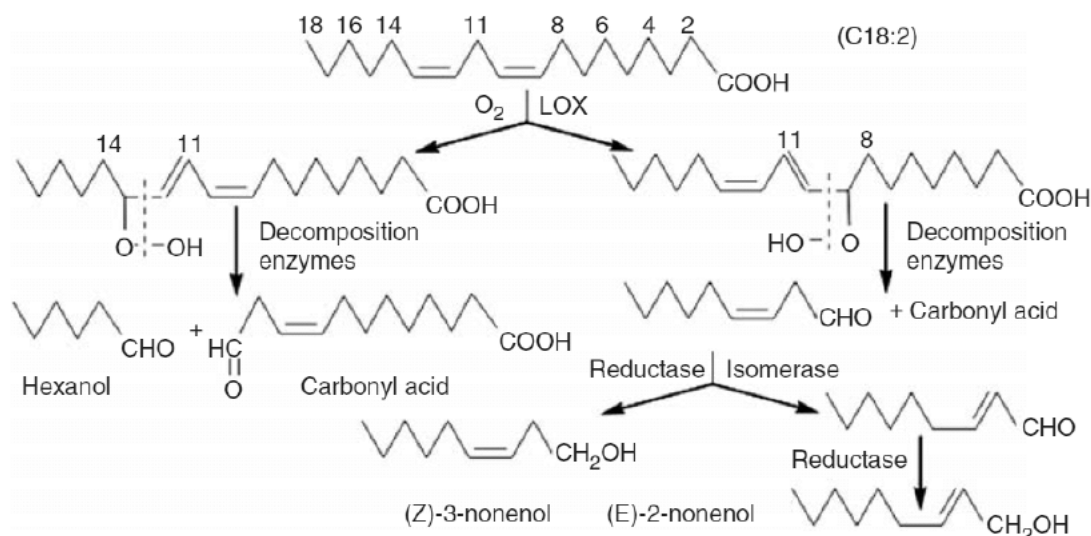


Figura 6. Ruta biosintética de alcoholes y aldehídos insaturados C6 y C9 con el ácido linoleico como precursor (Ma et al. 2007).

2.3.3 Compuestos derivados del azufre.

De la degradación enzimática de la cisteína a partir de la metionina se obtiene el metanotiol o MTL (CH₄S), un compuesto derivado del azufre que actúa como intermediario en la formación de tioésteres y sulfuros (tioéteres) (Fig. 7). La metionina se puede convertir en metanotiol por vías directas e indirectas. La conversión directa es posible a través de la actividad de una enzima tal como L-metionina γ -liasa, cistationina β -liasa o cistationina γ -liasa. La vía indirecta implica una reacción de transaminación para convertir L-metionina a ácido 4-(metiltio)-2-cetobutanoico (KMBA), que posteriormente se convierte a metanotiol (Varlet y Fernández, 2010; Vallet et al. 2008).

El metanotiol, clasificado como un tiol, con una acidez débil es un gas incoloro con un olor similar al de la col podrida. Es una sustancia natural encontrada en numerosos medios orgánicos, la sangre, el cerebro, y otros animales así como tejidos vegetales. Es eliminado por heces animales. Se produce de forma natural con la descomposición bacteriana de las proteínas a partir de metionina y en algunos alimentos, como algunos frutos secos y queso, proceso que es realizado por diferentes microorganismos (Wikipedia 2013). El metanotiol se ha identificado en alimentos como el queso o la langosta contribuyendo al característico aroma a azufre, col y repollo hervido que tanto

rechazo genera entre los consumidores (Bentley et al. 2004; Singh et al. 2003; Varlet y Fernández, 2010). Este compuesto ha sido identificado en estudios previos en NILs de melón (Obando-Ulloa et al. 2010).

Los tioésteres son un grupo muy extendido en la bioquímica. Son compuestos con un grupo funcional CS-CO-C y son el producto de esterificación entre un ácido carboxílico y un tiol. Un sulfuro (tioéter) es un anión de azufre en su estado de oxidación más bajo de 2. Los tioéteres, entre los que se encuentran el trisulfuro dimetil o el disulfuro dimetil, se caracterizan por generar malos olores (Schawb et al. 2008).

En general los compuestos derivados del azufre se caracterizan por generar aromas indeseables o poco aceptados por los consumidores como el aroma a ajo, repollo cocido, mantequilla rancia o huevo podrido (Singh et al. 2003). Sin embargo, existen compuestos como 1-metilsulfanilbutan-1-ona o el metil 2-metilsulfanilacetato capaces de generar notas aromáticas a fruta tropical (Flavornet 2013; Pherobase 2013).

Otro compuesto derivado del azufre es la cetona pentano-2,3-diona, obtenida del metanotiol, vía catabolismo de la metionina (Arfi et al. 2006). Este es un compuesto característico de productos de la fermentación como el yogur y las leches fermentadas, y de bebidas alcohólicas como el vino y cerveza (Ott et al. 2000). En general, a este compuesto se le atribuye notas aromáticas a caramelo, mantequilla, queso, dulce, afrutado, cremoso y fresco (Pherobase 2013; Thee good scent company database 2013), sin embargo en productos como el jamón curado francés genera un aroma a rancio (Buscailhon et al. 1994).

Estudios en diversos cultivares de melón han confirmado la metionina como un importante precursor en la síntesis de compuestos derivados del azufre, como como S-metil tiobutanoato, S-metil tioacetato, 3-(metioltio) propanal, etil 2-(metioltio) acetato, etil 3-(metiltio) propanoato y 3-(metiltio) propil acetato, entre otros y que contribuyen al aroma del fruto de melón (Gonda et al. 2010, 2013; Song y Forney, 2007).

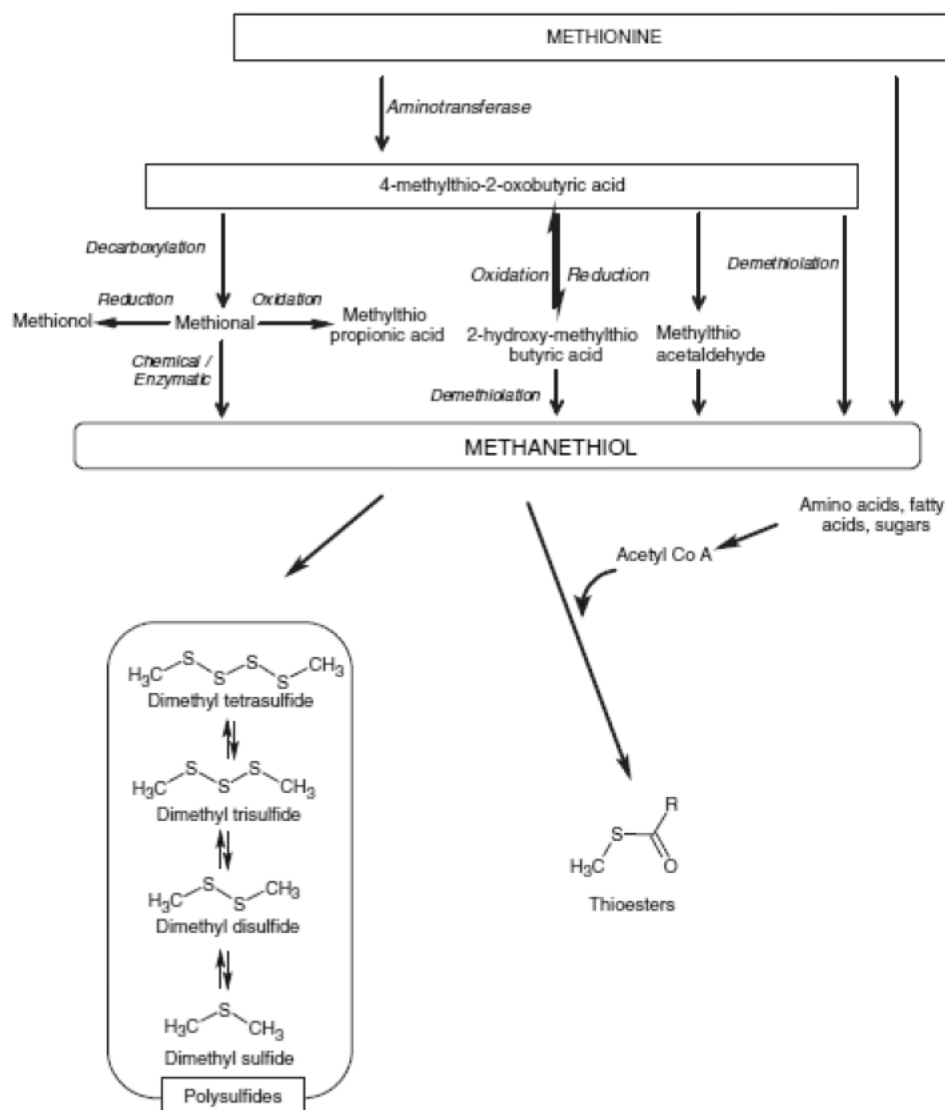


Figura 7. Degradación enzimática de la metionina y generación de compuestos derivados del azufre alifáticos (Varlet y Fernández, 2010).

2.4 Etileno y producción de compuestos volátiles en melón.

El etileno es una fitohormona importante en frutos climatéricos, que actúa iniciando y acelerando los procesos madurativos de los frutos, entre los que se encuentran cambios en el sabor. Se ha investigado mucho en los últimos años acerca de la relación existente entre etileno y sabor. El bloqueo en la generación de compuestos volátiles por inhibición de la enzima clave en la síntesis de etileno (ACC), ha puesto de manifiesto la importancia del papel que puede desempeñar el etileno en la biosíntesis de aromas volátiles de las frutas climatéricas (Gao et al. 2008).

Los frutos climatéricos de melón que se distinguen por su fragancia se caracterizan por sus aromas volátiles como un atributo de mayor calidad. Se cree que concentraciones más altas de la mayoría de los volátiles, sobre todo ésteres, están presentes en el melón climatérico Cantalupo, más que en el tipo no climatérico Honeydew. Los ésteres de acetato son los principales compuestos en las variedades climatéricas, junto con alcoholes y aldehídos de cadena corta (Alsmeirat y El Assi, 2010).

Los resultados de Shalit et al, (2006) indican que en frutos de melón maduros pertenecientes al cultivar climatérico Arava, la composición de volátiles difiere en gran medida de la obtenida de frutos inmaduros del mismo cultivar y de frutos tanto maduros como inmaduros de un cultivar de melón no climatérico (*Cucumis melo* var. *inodorus* cv. Rochet). Mientras que el cultivar climatérico destaca por su contenido en ésteres, especialmente acetatos, aldehídos y alcoholes son más comunes en el cultivar no climatérico (Shalit et al. 2006).

Se ha demostrado que melones climatéricos del grupo *reticulatus* tienen una alta actividad de la enzima AAT, siendo esta despreciable en melones no climatéricos del grupo *inodorus* (Flores et al. 2002). En melón existen al menos cuatro genes (Cm-AAT1, Cm-AAT2 Cm-AAT3, y Cm-AAT4) que codifican AATs. Todos menos Cm-AAT2, son activos en la producción de ésteres y están caracterizados por frutos con una expresión específica y dependientes del etileno. CM-AAT1 produce una amplia gama de ésteres de acilo de cadena corta y larga, pero tiene marcada preferencia por la formación de E-2-hexenil acetato y hexanoato de hexilo. CM-AAT1 juega un papel importante en la producción de compuestos volátiles que dan el olor característico de melón. CM-AAT3 es capaz de catalizar la formación de ésteres a partir de una amplia variedad de sustratos (alcoholes y acil CoA), pero con una preferencia muy fuerte por la producción de acetato de bencilo. Su máxima actividad es en gran medida del tipo alcohol bencílico acetil transferasas. Esta actividad es 150 veces mayor que la actividad de hexanol acetil transferasa y 4 veces mayor que etanol benzoil transferasas. CM-AAT4 se dedica casi exclusivamente a la formación de acetatos, con sólo tres tipos actividades de alcohol acil transferasas (hexanol acetil transferasas, (E)-hex-2-enol acetil transferasas y bencil alcohol acetil transferasas) y con marcada preferencia por el acetato de cinnamoil. La actividad (E)-hex-2-enol acetil transferasa es alrededor de 40

veces más que bencil y hexanol acetil transferasas (Flores et al. 2005; Lucchetta et al. 2007ab).

La producción de ésteres alifáticos, como el acetato de butilo y el acetato de hexilo, están bloqueadas en frutas ACO antisentido y puede ser revertida mediante tratamiento con etileno. La reducción de ácidos grasos y aldehídos parece ser esencialmente dependiente de etileno, mientras que el último paso de acetilación del alcohol tiene componentes dependientes e independientes de la acción del etileno, seguramente por una diferente regulación de la AAT (Flores et al. 2002; Li et al. 2006), debido a que diferentes isoenzimas de AAT catalizan el último paso en la producción de ésteres (Obando-Ulloa et al. 2009b).

Los ésteres de cadena lineal, junto con ésteres de cadena ramificada derivados de la valina y la isoleucina son volátiles mayoritarios en frutos de melón ‘Charentais’ (*Cucumis melo* var. *cantalupensis* Naud. cv. ‘Védrandais’). Los ésteres son cuantitativamente los compuestos más importantes y contribuyen de forma importante al aroma único de frutas maduras de melón.

En melones transformados con una oxidasa antisentido (ACO) se demostró el papel del etileno en la producción de aromas, con una reducción considerable en la composición volátil total, siendo los compuestos con mayor poder aromatizante los más afectados por la transformación. El papel del etileno fue mayor en la ruta que conduce a la formación de ésteres de etilo con cadenas ramificadas de grupos acilo a partir de aminoácidos, que en la formación de acetatos con cadenas laterales con mitades de alcohol (Bauchot et al. 1998; Flores et al. 2005).

En frutos de melón ‘Charentais’ se han identificado dos genes de ADH (Cm-ADH1 y Cm-ADH2), regulados positivamente por el etileno y cuya expresión aumenta con la maduración del fruto. Las mismas operan preferentemente como reductasas de aldehídos a alcoholes, sustratos necesarios para la biosíntesis ésteres volátiles en melón. Ambos genes muestran una fuerte preferencia por aldehídos alifáticos pero Cm-ADH1 es capaz de reducir aldehídos ramificados tales como 3-metilbutiraldehído, mientras Cm-ADH2 no puede reducir este tipo de sustrato (Manríquez et al. 2006; Pérez y Sanz, 2008).

Los ésteres han sido establecidos como típicos compuestos volátiles de NILs de melón climáticas, mientras que los aldehídos son característicos de NILs no-climáticas (Obando-Ulloa et al. 2008), con predominio del hexanal y metanotiolato en

particular (Obando-Ulloa et al. 2010). Por otra parte, las NILs de melón climatéricas indicaron un aumento más evidente con la senescencia en el contenido relativo de determinados compuestos aromáticos que las NILs no climatéricas. Sin embargo, una simplificación del perfil de aromas en NILs no climatéricas debido a la reducción del contenido relativo de ésteres y aldehídos en comparación con los niveles de estos compuestos en la cosecha apoyan la hipótesis de una producción de aromas volátiles etileno-independiente en melón (Obando-Ulloa et al. 2009b).

2.5 QTLs y compuestos volátiles en melón.

En los últimos tiempos se han realizado progresos importantes en la determinación de las vías responsables de las biosíntesis de compuestos volátiles en plantas, lo que ha resultado en la identificación de genes que codifican muchas enzimas biosintéticas. La principal ventaja del análisis de QTLs en comparación con los enfoques anteriores, es que permite la identificación del loci que, por definición, altera el rasgo objetivo en poblaciones naturales (y mapeadas). Además, el análisis de QTLs puede contribuir a aumentar el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la producción de compuestos volátiles en las frutas, y que hoy en día son en gran parte desconocidos (Zorrilla-Fontanesi et al. 2012)

Aunque algunos trabajos sobre QTLs se han hecho en poblaciones de melón, identificando los compuestos volátiles importantes, el conocimiento de la relación entre aromas volátiles y el análisis de QTLs es limitado. Resultados previos de Obando-Ulloa et al. (2008, 2010) indican el potencial existente en las poblaciones de melón para el mapeo de QTLs asociados a compuestos volátiles aromáticos. En otros cultivos frutales, tanto climatéricos como no climatéricos, incluyendo manzana, uva, melocotón, fresa o tomate también se han identificado QTLs asociados a sus aromas característicos (Dunemann et al. 2009; Eduardo et al. 2013; Klee et al. 2010; Mathieu et al. 2009; Zorrilla-Fontanesi et al. 2012).

Utilizando NILs de melón no climatéricas, Obando-Ulloa et al. (2010) caracterizó, salvo algunas de ellas, el perfil de aromas en esta colección principal de NILs. El perfil estuvo definido por un total de 24 compuestos detectados en PS o en las NILs; tres ésteres, seis aldehídos, tres alcanos, tres hidrocarburos aromáticos, dos terpenos, dos cetonas, un alcohol, un compuesto derivado de azufre, un alqueno cíclico ramificado, un

naftaleno y un éter. Estos resultados permitieron mapear cuatro QTLs en relación a los LGs IV, VIII y XI asociados con la formación de 3-hidroxi-2,4,4-trimetilpentilo 2-metilpropanoato, octanal y (Z,Z)-3,6-nonadienal. El mapeo de QTLs requiere de un análisis exhaustivo de bastantes réplicas tanto de las NILs como del parental, motivo por el cual los resultados existentes publicados son limitados.

3. PARED CELULAR

3. PARED CELULAR

3.1. Pared celular vegetal. Definición.

La pared celular es una compleja estructura, organizada y dinámica por naturaleza que actúa como soporte estructural y mecánico de las células que constituyen diferentes tejidos en las plantas, jugando un papel importante en los cambios de textura (Negi y Handa, 2008; Stolle-Smits et al. 1999; Vicente et al. 2007). Entre sus componentes se encuentran muchos polisacáridos, diferentes proteínas y sustancias aromáticas que definen las características de las células individuales dentro del cuerpo de la planta (Brummell 2006). Su estructura básica consiste en un núcleo de microfibrillas de celulosa embebido en redes coextensivas de pectina y hemicelulosa (Bennett 2002).

La integridad de los tejidos de la plantas depende en gran medida de la degradación de la pared celular primaria (Rose et al. 1998), y de la composición y estructura de los polisacáridos de la lámina media (Simandjuntak et al. 1996).

3.2 Componentes de la pared celular.

3.2.1 Pared celular primaria.

La pared celular primaria es una compleja estructura de redes presente en las células de la pulpa de las frutas (Fig. 1). En las plantas, las paredes celulares primarias se establecen con el crecimiento y aumento de volumen de las células y el cese del crecimiento de las células indica la formación de la pared celular secundaria y de grandes depósitos de lignina. Varios tipos de moléculas poliméricas son los componentes de la pared celular primaria: polisacáridos pécticos, celulosa, hemicelulosa, y proteínas, así como compuestos fenólicos. Sus características, contenido y estructura varían en función de la especie, etapa de desarrollo, y la diferenciación de la célula vegetal y tejidos (Brownleader et al. 1999; Brummell 2006).

La mayoría de las paredes celulares de los tejidos en crecimiento de las frutas comestibles tienen una arquitectura y composición característica de pared celular primaria Tipo I, que generalmente se encuentra entre todas las plantas dicotiledóneas y alrededor de la mitad de las especies monocotiledóneas. La estructura de estas paredes tipo I consiste en redes de xiloglucano-microfibrillas celulosa dentro de una matriz de polisacáridos pécticos complejos. Los homogalacturonanos (HGs) y

ramnogalacturonanos (RGs) constituyen las dos redes troncales más importantes de polisacáridos pécticos (Peña y Carpita, 2004).

3.2.2 Lámina media.

La lamina media está constituida principalmente por polisacáridos pécticos que se cree se sitúan entre las células adyacentes actuando como adhesivo intercelular, lo que permite que las células se mueven en respuesta a fuerzas de compresión. Es una estructura termolábil y su disolución da como resultado la separación de las células vegetales (Prasanna et al. 2007; Ratnayake et al. 2003; Rodríguez et al. 2004).

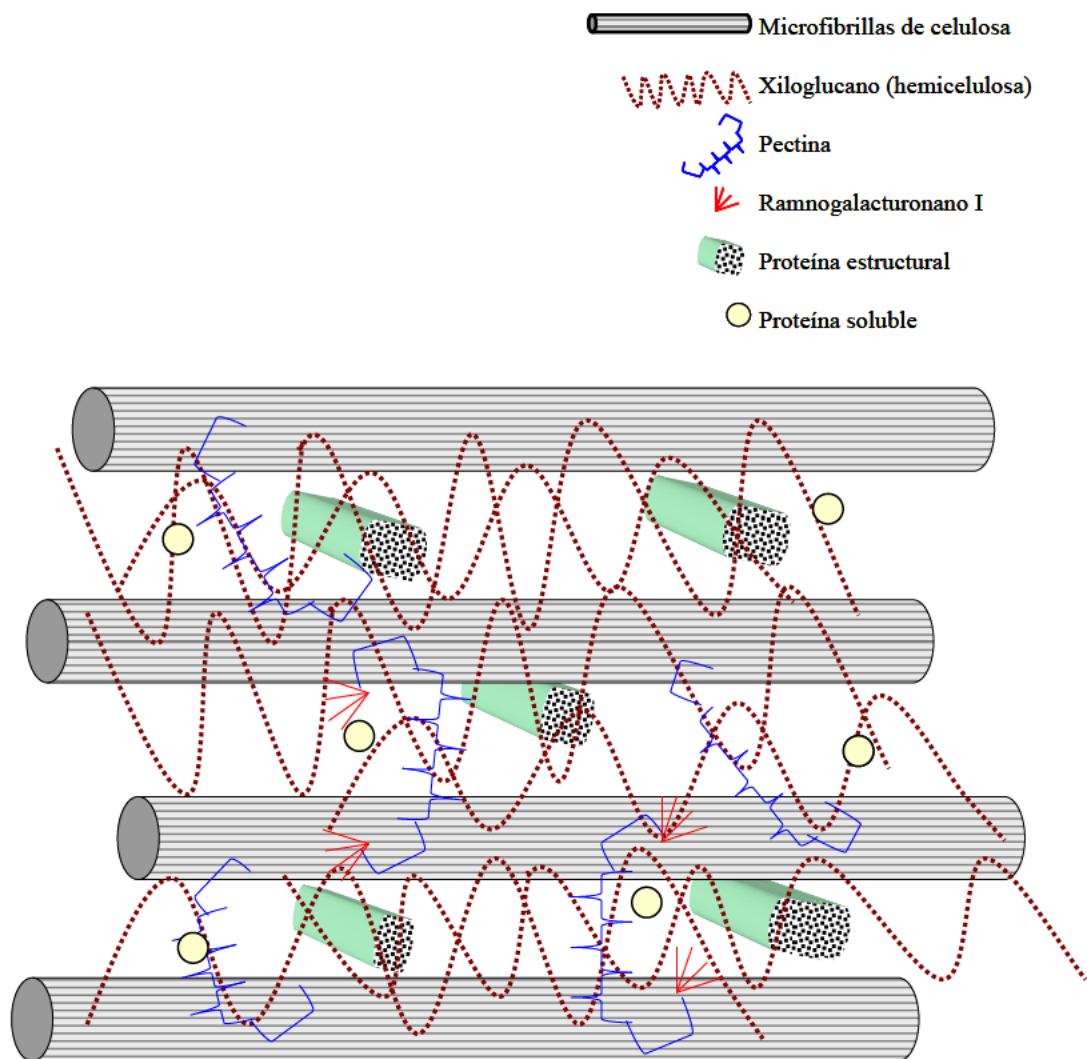


Figura 1. Estructura fundamental de la pared celular primaria constituida por microfibrillas de celulosa incluidas en redes coextensivas de pectina y hemicelulosa (Dos-Santos, elaboración propia basado en la figura de Brownleader et al. 1999).

3.2.3 Pectina, hemicelulosa y celulosa.

Las pectinas, hemicelulosas y la celulosa son los principales polisacáridos de pared implicados en las modificaciones de esta durante la maduración y almacenamiento de la fruta siendo varias las enzimas modificadoras de pared las que contribuyen a los procesos de solubilización, desesterificación y despolimerización de estos componentes polisacáridicos (Nishizawa e Ito, 2007; Prassana et al. 2007; Waldron et al. 2003).

Las pectinas y hemicelulosas juegan un papel importante en las propiedades reológicas de la pulpa de la fruta contribuyendo a su firmeza (Orfila et al. 2007; Saladié et al. 2007; Simandjuntak et al. 1996).

3.2.3.1 Pectinas.

Por lo general, la pared celular de la fruta está altamente enriquecidas en pectinas (a menudo más del 50% de la pared) y su composición es probable que varíe considerablemente entre especies (Brummell y Harpster, 2001).

Las pectinas constituyen un grupo de polisacáridos ricos en ácido galacturónico (GalA), ramnosa (Ram), arabinosa (Ara) y galactosa (Gal) y otros monosacáridos presentes en menor cantidad (Immerzeel et al. 2006). Estos componentes básicos de las pectinas generan RGs I y II arabinanos, HGs, galactanos y arabinogalactanos como componentes estructurales (Brownleader et al. 1999).

3.2.3.1.1 Homogalacturonanos y ramnogalacturonanos.

Los HGs junto con los RGs (I y II) son los tres componentes clave de la matriz péctica de la célula vegetal (Dumville y Fry, 2000; Pérez-Almeida y Carpita, 2006). Los polímeros lineales de HGs y RGs se denominan poliurónidos y son los principales componentes de la pared celular de las frutas (Wakabayashi 2000).

- Los HGs están constituidos fundamentalmente por cadenas ramificadas de residuos de α -1-(4)-D-GalA (que pueden ser metil-esterificados o acetilados).
- Los RGsI son polímeros constituidos por unidades de ramnosa y residuos de GalA con cadenas laterales de galactosa y arabinosa que se unen para enmarcar la ramnosa (Figs. 2 y 3).
- Los RGsII son polisacáridos complejos que se encuentran en pequeñas cantidades en algunas paredes de las células vegetales y están constituidos fundamentalmente por GalA esterificado (Waldron et al. 2003) y algunos

monosacáridos que raramente se encuentran en otros polímeros, como la 2-O-metil-D-xilosa (Brownleader et al. 1999).

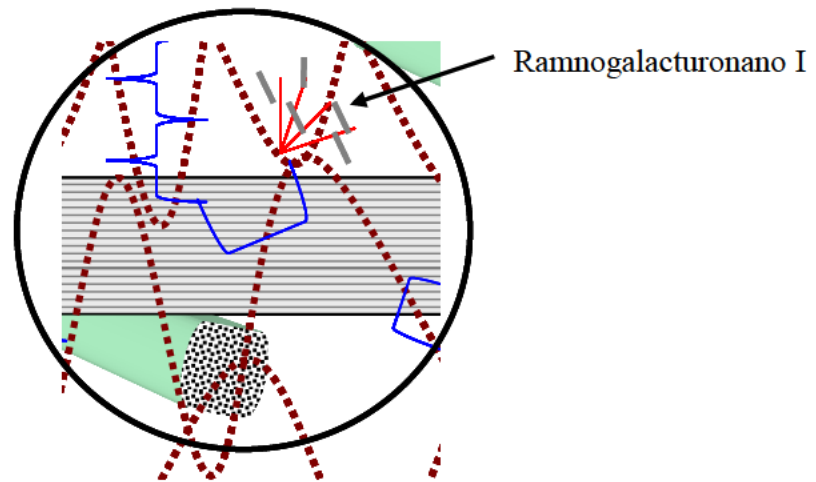


Figura 2. Detalle de los componentes de la pared (Dos-Santos, elaboración propia).

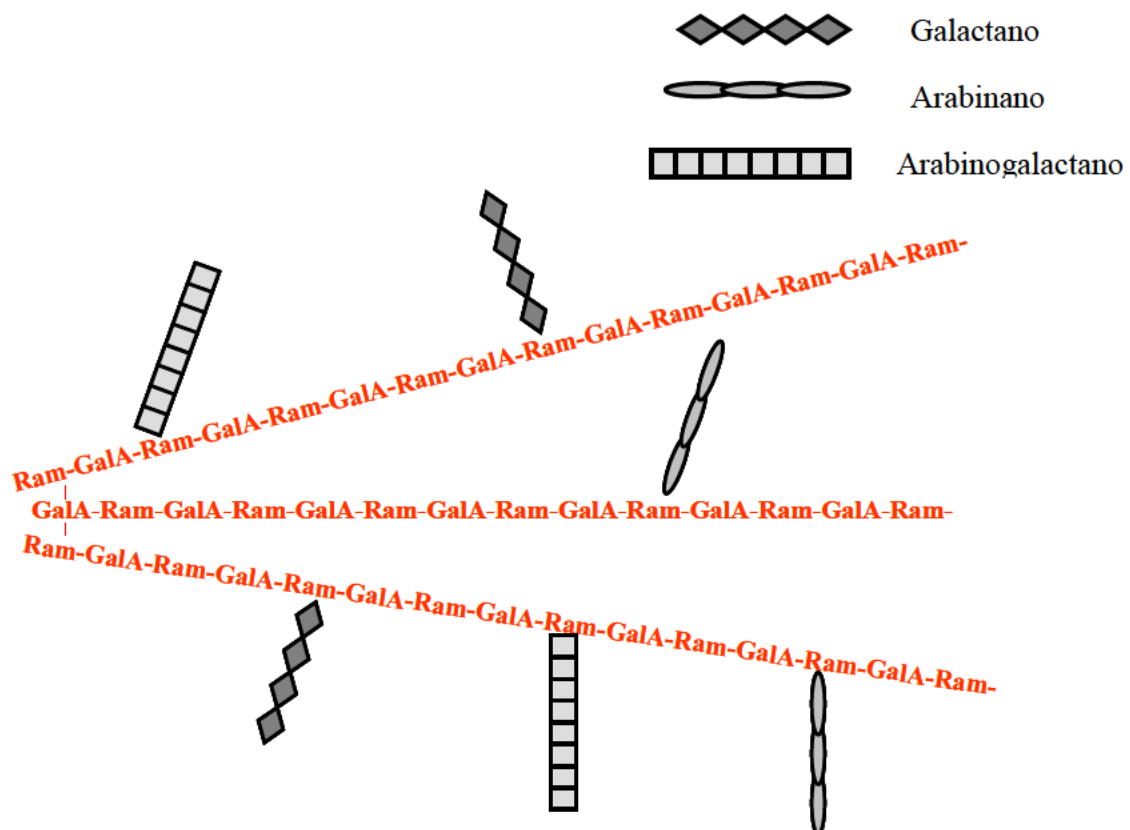


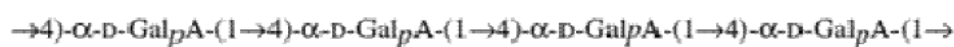
Figura 3. Estructura fundamental de ramnoglacturonano tipo I (RG1) con esqueleto altermo de unidades de α -D(1 \rightarrow 2) ramnosa y α -D(1 \rightarrow 2) ácido galacturónico (GalA) portando cadenas laterales de galactano, arabinano y arabinogalactano (Dos-Santos, elaboración propia).

3.2.3.1.2 Arabinanos, galactanos y arabinogalactanos.

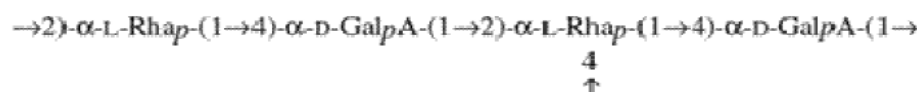
Estos polímeros pueden existir en forma libre en la pared celular primaria y/o como constituyentes de polisacáridos pécticos (Brownleader et al. 1999; Rose et al. 1998).

- Los arabinanos (Fig. 4) son cadenas ramificadas de polisacáridos compuestos de residuos de L-arabinosa con enlaces α -(1→5) que contienen solo cadenas laterales de L-arabinosa.
- Los galactanos (Fig. 4) son cadenas lineales de residuos de D-galactosa unidos mediante enlaces β -(1→4) y se presentan como cadenas de oligosacáridos unidas a los residuos de ramnosa de la columna vertebral de los RGs.
- Los arabinogalactanos (Fig. 4) son heteropolímeros de D-galactosa y residuos de L-arabinosa. y existen en las plantas en dos formas estructurales. Los arabinogalactanos I que son polisacáridos simples compuestos de cadenas β -(1→4) de D-galactosa con residuos de L-arabinosa y los arabinogalactanos II que son polisacáridos ramificados formados por D-galactosa β -(1→3) unida a galactosa β -(1→6) en la posición O-6. Las posiciones O-3 y O-6 de las cadenas laterales tienen vinculaciones con la L-arabinosa (Prasanna et al. 2007).

Homogalacturonano

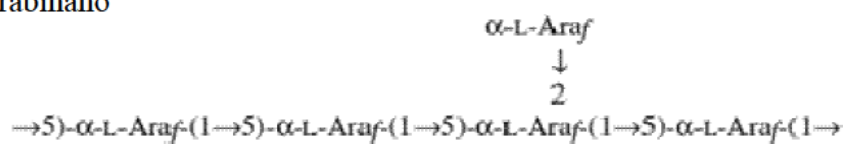


Ramnogalactutronano I

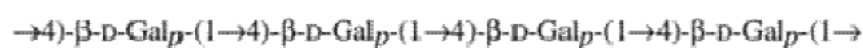
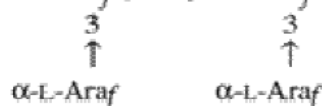


Principalmente arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Tipo I).

Arabinano



Galactano



Arabinogalactano (Tipo I)

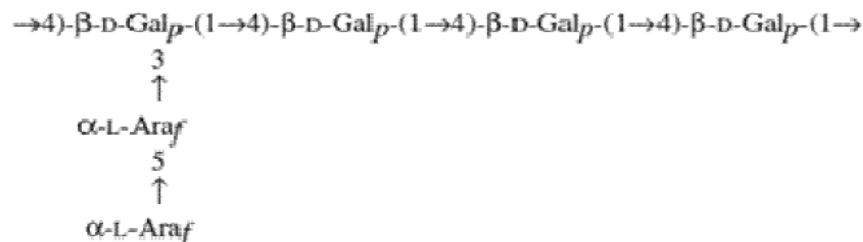


Figura 4. Estructuras más comunes de polisacáridos pécticos: Homogalacturonano y ramnogalacturonano I. Ramnogalacturonano posee cadenas de arabinano, galactano y arabinogalactano (Tipo I). Los residuos de ácido galacturónico de homogalacturonano pueden ser metil esterificados o acetilados (Harris y Smith, 2006).

3.2.3.2 Hemicelulosa.

Las hemicelulosas son polisacáridos (neutros) extraídos por soluciones alcalinas de los residuos de la pared celular después de la extracción de polisacáridos pécticos (Prasanna et al. 2007). Estos polisacáridos se encuentran en la pared celular primaria y secundaria de los tejidos vegetales de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, y pueden variar mucho en función del tipo de célula y las especies (Waldron et al. 2003).

Las hemicelulosas están constituidas por una columna de β -glucano unida fundamentalmente a residuos de glucosa, manosa y xilosa (Bennett y Labavitch, 2008).

En la integridad estructural de la pared celular, la matriz hemicelulósica juega un papel al menos tan importante como de la matriz péctica. En general, las hemicelulosas principalmente xilanas y xiloglucanos, están conectadas por medio de puentes de hidrógeno y entrecruzamientos con las microfibrillas de celulosa. La formación de la red de celulosa-hemicelulosa probablemente da la resistencia (rigidez) a las paredes celulares (Bennett y Labavitch, 2008; Cheng et al. 2009).

3.2.3.2.1 Xiloglucanos.

Los xiloglucanos (XGs) representan una proporción importante de la pared celular en los vegetales comestibles y frutos de plantas dicotiledóneas (Waldron et al. 2003), alcanzando de un cuarto a un tercio de los polisacáridos de la pared celular en el melón (Wakabayashi 2000). Los xiloglucanos (Fig. 5) son los componentes principales de la pared celular de las hemicelulosas y tienen una estructura de residuos de glucosa unidos mediante enlaces β -D(1 \rightarrow 4) que son altamente sustituidos por cadenas laterales de xilosa unidos mediante enlaces α -D(1 \rightarrow 6) y a veces ampliadas con galactosa, fucosa o arabinosa (Brownleader et al. 1999; Brummell 2006). Su despolimerización se ha observado en las primeras etapas de ablandamiento de los frutos, como el melón (Bennett 2002; Wakabayashi 2000).

La xilosa y glucosa son los azúcares neutros más importantes de los xiloglucanos y su contenido disminuye de forma paralela a la reducción del tamaño molecular de los xiloglucanos (Figueroa et al. 2010). Altos niveles de glucosa, xilosa y galactosa se han observado en la composición monosacáridica de la fracción de hemicelulosa de melones climatéricos tipo Galia (Menezes et al. 1997).

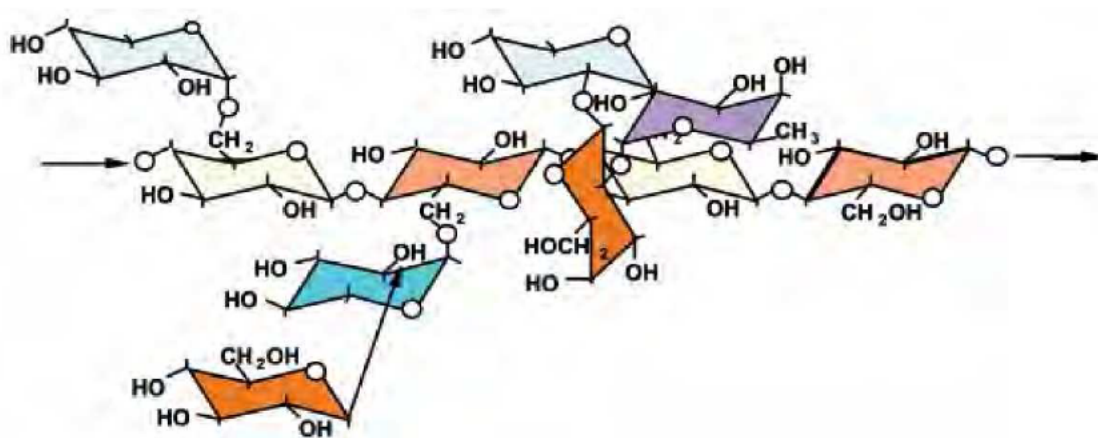


Figura 5. Estructura molecular del xiloglucano con cuatro unidades de β -D(1 \rightarrow 4) glucosa (rosa-naranja), con tres residuos consecutivos sustituidos con unidades de α -D(1 \rightarrow 6) xilosa (azul). Cerca de la mitad de estas unidades contienen extensiones de residuos de β -D galactosa-(1 \rightarrow 2) L-fucosa-(1 \rightarrow 2)- (mostaza y violeta respectivamente) añadidos a la primera posición (Pérez-Almeida et al. 2006).

3.2.3.2.2 Xilanas.

Las xilanas, además de otros componentes hemicelulósicos, se han encontrado en diferentes especies frutales, siendo importantes en las paredes celulares primaria y secundaria de las plantas monocotiledóneas y presentes en pequeñas cantidades en la pared celular de plantas dicotiledóneas como el melón. Sin embargo, estos son componentes menores y los cambios de estos polisacáridos durante la maduración siguen siendo relativamente desconocidos (Rose et al. 1998; Waldron et al. 2003).

3.2.3.3 Celulosa.

La celulosa (CEL) es el material cristalino, inerte e insoluble de la pared celular que queda tras la extracción de la hemicelulosa y que se compone principalmente de β -glucosa (Prasanna et al. 2007). La celulosa (Fig. 6) es un polisacárido de cadena lineal que contiene de 3000 a 5000 residuos de D-glucosa conectados mediante enlaces β -(1 \rightarrow 4) y aproximadamente entre 30 y 100 de estas cadenas constituyen las microfibrillas de celulosa. Las microfibrillas son estructuras delgadas y largas que se cruzan entre sí mediante puentes de hidrógeno interpoliméricos generando una estructura amorfa (Bennett y Labavitch, 2008; Brownleader et al. 1999). Las microfibrillas de celulosa y los xiloglucanos interactúan a través de puentes de hidrógenos cruzados responsables

del mantenimiento y la fuerza de la estructura de la red observada microscópicamente (Brownleader, 1999; Ratnayake et al. 2003). Este entramado de xiloglucano-celulosa está incrustado en una matriz amorfa de pectina compuesta de poliurónidos junto con un dominio de otros componentes menos abundantes, como compuestos fenólicos, proteínas estructurales, enzimas y moléculas que interactúan con receptores (Goulao y Oliveira, 2008). La ruptura de la matriz de celulosa y xiloglucano puede ser un elemento clave en la regulación de integridad de la pared (Rose et al. 1998).

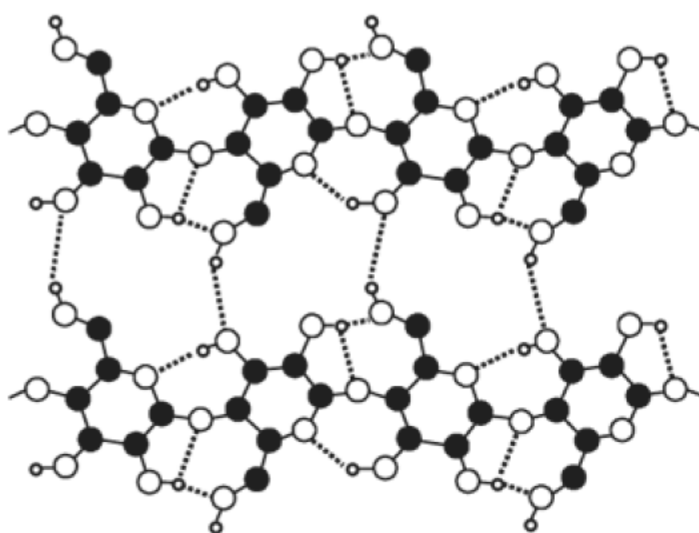


Figura 6. Estructura de celulosa unida mediante puentes de hidrógeno. Los puentes de hidrógeno se representan mediante líneas punteadas. Carbono (●), oxígeno (○) y átomos de deuterio (Nishiyama et al. 2002).

3.2.4 Azúcares neutros.

Entre los principales azúcares neutros (AN) constituyentes de la pared celular del fruto de melón se encuentran la glucosa, galactosa, manosa, xilosa, arabinosa, ramnosa y fucosa. La galactosa, arabinosa y la ramnosa son monosacáridos pécticos y se han encontrado como importantes constituyentes de una típica composición en diferentes cultivares de melón (Rose et al. 1998; Simandjuntak et al. 1996). La fucosa, xilosa, manosa y la glucosa son monosacáridos hemicelulósicos. La ramnosa es un componente estructural de los RGs (Immerzeel et al. 2006).

La manosa es especialmente importante para las interrelaciones entre los polímeros de xiloglucano en las microfibrillas de hemicelulosas y celulosa (Nishizawa e Ito, 2007). La xilosa junto a la glucosa son componentes característicos de los xiloglucanos

(Brummell y Harpster, 2001; Figueroa et al. 2010). Las unidades de fucosa han sido identificadas como componentes de los xiloglucanos (Kurz et al. 2008).

La composición de azúcares neutros de la pared celular varía de fruta a fruta, con importantes cambios en su composición durante la maduración (Prasanna et al. 2007).

3.2.5 Ácidos urónicos.

Los ácidos urónicos (AU) son compuestos similares a los azúcares, excepto que el carbono terminal se ha oxidado del alcohol a un grupo carboxil como el caso del GalA. El ácido D-GalA es un monosacárido de seis átomos de carbono correspondiente a la forma oxidada de la D-galactosa, que junto con los azúcares neutros, como la L-ramnosa, L-arabinosa y D-galactosa es el principal componente de las pectinas. Los residuos de ácido D-GalA están covalentemente unidos para formar una columna vertebral lineal junto con los azúcares neutros (Yapo et al. 2008).

3.3 Degradación de la pared celular.

Durante la maduración de las frutas los polímeros que constituyen la estructura de la pared celular son progresivamente modificados dando lugar al desmontaje de la pared celular primaria y la lámina media y por ende a modificaciones de la textura. Se han desarrollado extensas investigaciones para elucidar los mecanismos responsables de los cambios de textura de la pared celular que ocurren durante la maduración poscosecha de las fruta (Manganaris et al. 2005; Manrique et al. 2004).

La solubilización y despolimerización de los polisacáridos de la pared celular, su reorganización y la pérdida del contenido de azúcares neutros de las pectinas y las hemicelulosas son fenómenos que tienen lugar durante la maduración de la mayoría de las especies frutales (Brummell y Harpster, 2001; Goulao et al. 2010; Rose et al. 1998).

En muchas frutas la solubilización de las sustancias pécticas es un fenómeno universal que acompaña a la maduración de la fruta al actuar sobre el metabolismo de la pared celular (Karakurt et al. 2008; Prasanna et al. 2007) mientras que la despolimerización puede ocurrir solo en algunas especies (Goulao et al. 2010). La solubilización y despolimerización de las pectinas son dos eventos independientes y la enzima poligalacturonasa tiene un papel importante sólo en la solubilización de la pectina, sin intervención en el ablandamiento (Manrique y Lajolo, 2004).

La despolimerización de poliurónidos quelantes solubles tiene consecuencias importantes en la resistencia de las conexiones célula-célula y por lo tanto en el ablandamiento y textura, pero la gran variabilidad en el grado de despolimerización entre especies durante la maduración sugiere que la alteración de la adhesión intercelular es un componente de mayor importancia en los cambios texturales de algunas especies que de otras. La despolimerización temprana de poliurónidos a menudo no correlaciona con el ablandamiento durante en la maduración, ya que la más extensa despolimerización ocurre tardíamente y está normalmente asociada con una disminución importante en la firmeza (Brummell 2006). En melón, la despolimerización de la pectina enlazada iónicamente es relativamente pequeña durante la maduración (Brummell et al. 2004).

Junto con la solubilización de pectinas, la pérdida de azúcares neutros de las cadenas laterales de las pectinas parece ser un mecanismo común que acompaña a la maduración en todas las especies frutales. La pérdida de galactosa se ha considerado como uno de los eventos más importantes que acompaña a la maduración de numerosos frutos y es una de las modificaciones de la pectina mejor caracterizadas, indicando el papel dinámico de esta azúcar de la pared celular durante la maduración, pero la preferencia en la pérdida de azúcares neutros varía de acuerdo con la especie. La pérdida de galactosa es muy pronunciada en melón (*Cucumis melo* L.) (Brummell, 2006; Figueroa et al. 2010; Goulao et al. 2008; Pérez-Almeida y Carpita, 2006) y este proceso junto con la disminución de arabinosa, probablemente derivada de polisacáridos pécticos, ha sido descrito en numerosas especies de frutas (Manrique y Lajolo, 2004; Rose et al. 1998; Vicente et al. 2007; Wakabayashi, 2000).

Una asociación temporal entre la solubilización de poliurónidos y la pérdida de la galactosa se ha observado durante la etapa inicial de maduración de los frutos de melón (Wakabayashi 2000). En melón se ha descrito una disminución en el contenido total de poliurónidos, mientras que el contenido poliurónidos solubles aumentó con la maduración del melón (Simandjuntak et al. 1996). Un descenso en el contenido de ácidos urónicos se ha descrito en las fracciones pécticas de melón climatérico tipo Galia durante la maduración (Menezes et al. 1997).

Varios estudios confirman la contribución de las hemicelulosas al ablandamiento de la textura en melón reticulado, tomates y otras frutas. Sin embargo, existe un conocimiento limitado acerca de la despolimerización de hemicelulosa (Cheng et al.

2009). En la etapa inicial del ablandamiento de los frutos, la ruptura de las moléculas de hemicelulosa puede alterar en parte la red de celulosa-hemicelulosa, provocando a su vez una disminución en la rigidez de la pared celular en los tejidos del fruto (Cheng et al. 2009).

La disminución o pérdida de niveles considerables de monómeros característicos de hemicelulosas como glucosa, xilosa y manosa contribuyen a la maduración de los frutos (Prasanna et al. 2007) fundamentalmente a través de la despolimerización de los xiloglucanos. En melón tipo *Charentais* los eventos tempranos de ablandamiento estuvieron relacionados con el desmontaje regulado de una fracción fuertemente ligada de xiloglucanos, mientras que los procesos tardíos de ablandamiento estuvieron asociados al desmantelamiento de pectinas (Rose et al. 1998)

En frutos como fresa pimienta, mango, melocotón y melón se han identificado cambios asociados a la maduración que envuelven una dramática disminución en la reducción del tamaño molecular de la hemicelulosa (Bennett y Labavitch, 2008).

En muchos casos, la microfibrillas de celulosa no son desmanteladas durante los procesos normales de desarrollo de las plantas, incluida la maduración de la mayoría de frutas, como el melocotón (Bennett 2001, 2002; Manganaris et al. 2006). Por lo que el desmontaje de la celulosa no es un contribuyente importante en los cambios de la pared celular durante la maduración (Mbéguié-A-Mbéguié et al. 2009) siendo el desmantelamiento de la matriz no-celulósica la que resulta en una pérdida aparente de la organización microfibrilar (Bennett y Labavitch, 2008). Por tanto, a pesar de que la celulosa es el polisacárido predominante en la pared celular de la pulpa de melón, su papel en el ablandamiento no está claro. En dos variedades de melón ‘Wasada Uri’ y ‘Prince’ almacenadas a 20°C los valores de celulosa se mantuvieron constantes durante el tiempo de almacenamiento (Nishizawa e Ito, 2007).

3.4 Textura de las fruta.

3.4.1 Definición de textura.

Las propiedades texturales de un alimento son un grupo de características físicas percibidas por la sensación del tacto y que se relacionan con la deformación, desintegración y flujo del alimento bajo la aplicación de una fuerza, y se miden objetivamente por las funciones de la fuerza, tiempo y la distancia (Sams 1999).

Junto con el sabor y el aroma, una adecuada textura es un parámetro determinante en las preferencias de los consumidores en la elección de los frutos de melón (Lester 2006b).

La textura ya por sí sola es un parámetro importante a la hora de definir objetivamente la calidad de una fruta u hortaliza. Los cambios en las propiedades mecánicas de las frutas han sido ampliamente investigados, tanto sensorialmente como instrumentalmente, por la necesidad de comprender los procesos biológicos asociados con el ablandamiento de la fruta, a fin de optimizar el tiempo en que las frutas se pueden almacenar con fines comerciales y entender las respuestas del consumidor a un producto biológico que rápidamente se ablanda durante la maduración (Harker et al. 2003; Harker y Johnston, 2008).

3.4.2 Métodos de medida de textura.

Los métodos de medición de la textura pueden ser sensoriales, mediante un panel entrenado de catadores o bien instrumentales mediante una amplia gama de técnicas como compresión, punción, tensión y vibración. Se emplean equipos especialmente diseñados como texturometros para los ensayos de compresión o penetrómetros para las pruebas de punción (Chaïb et al. 2007; Harker et al. 1997).

Los atributos de textura son más o menos difíciles de correlacionar con las mediciones instrumentales. La firmeza en boca está en parte correlacionada con la medición instrumental de la firmeza de la fruta (Causse 2008).

3.4.3 Atributos de textura.

Desde el punto de vista sensorial, la textura de los alimentos se divide convencionalmente en tres clases de propiedades: mecánicas, geométricas asociadas a boca y otra clase que incluye el contenido de agua.

Entre los numerosos atributos que definen la textura de un fruto se pueden citar la dureza del fruto entero y firmeza que son propiedades mecánicas, la fibrosidad y harinosidad de la pulpa como propiedad geométrica y la jugosidad de la pulpa que estaría en relación al contenido en agua (Harker y Johnston, 2008). Entre los atributos de calidad de consumo de melón habitualmente medidos también sensorialmente se incluyen una textura de la pulpa firme, crujiente y/o jugosa (Obando et al. 2008).

3.4.3.1 Dureza del fruto entero.

Para medir este atributo se emplea un test de compresión que evalúa la fuerza máxima requerida hasta un valor de compresión predefinido de la fruta (Chaïb et al. 2007; Tijkens et al. 2009). Este límite de compresión se establece dentro de la zona elástica de la curva de deformación (2-3 mm), especialmente en ensayos de seguimiento de la dureza durante la maduración.

Esta medida es importante en los melones enteros, puesto que los melones por lo general, se hacinan en el campo (con o sin sombreado) y en cajas de transporte a la espera de empacadoras o los mercados locales. Los frutos de melón de NILs se ablandan de acuerdo a un proceso exponencial y comparten no sólo el mismo mecanismo, sino también la misma tasa constante de ablandamiento. Sin embargo, el valor final de la dureza de cada fruto dependerá de su valor inicial de dureza (Tijkens et al. 2009).

3.4.3.2 Firmeza de la pulpa.

Mediante una prueba de punción se determina la resistencia de la pulpa de los frutos a la penetración. Se emplea un penetrómetro que se basa en la introducción de una cabeza cilíndrica en la pulpa de la fruta pelada para medir la fuerza máxima de penetración (García-Ramos et al. 2006; Molina-Delgado et al. 2009). La fuerza máxima de ruptura en N es lo que se denomina firmeza. Los valores de firmeza entre 4 y 10 N (valores estándar obtenidos con un penetrómetro fijado a 7,9 mm) son representativos de la madurez en una serie de frutos listos para el consumo en el caso de hacerse sobre los mismos enteros. Otros valores pueden obtenerse si se realiza el ensayo en base a cilindros de pulpa normalizados (Fernández-Trujillo et al. 2005), lo cual es habitual cuando las comparaciones se realizan entre variedades con diferentes tamaños y estructura del fruto.

Sensorialmente la firmeza es la fuerza requerida para comprimir la muestra con los dientes posteriores en la masticación (Harker y Johnston, 2008). Uno de los cambios más característicos que ocurren en la maduración de los frutos es el descenso en los valores de firmeza (Goulao et al. 2008; Prasanna et al. 2007).

3.4.3.3 Jugosidad de la pulpa.

En un aspecto importante de la textura que a menudo se mide de acuerdo a la cantidad de zumo liberado durante la homogeneización en relación a la cantidad de tejido empleado (Harker et al. 1998). Desde el punto de vista sensorial, es la cantidad de líquido libre liberado de la muestra durante la masticación (Harker y Johnston, 2008). En melón existe una relación entre la firmeza de la pulpa y la jugosidad, siendo la fruta con mayor firmeza menos jugosa (Obando et al. 2008).

3.4.3.4 Fibrosidad de la pulpa.

Sensorialmente es la cantidad de filamentos presentes en el fruto y que se separan fácilmente (Harker y Johnston, 2008).

3.4.3.5 Harinosidad.

Este atributo se caracteriza por la presencia de una cantidad de pequeñas partículas grumosas que se hace evidente durante la masticación acompañado de falta de jugosidad de la pulpa (Fernández-Trujillo et al. 2008; Harker y Johnston, 2008).

En frutos como el melocotón, la harinosidad de la pulpa es la expresión fenotípica del trastorno conocido como daño por frío, un desorden fisiológico que suele afectar a frutas de hueso y conservadas durante largos períodos de tiempo en almacenamiento en frío. Numerosos estudios realizados para entender el mecanismo de harinosidad, indican que debe atribuirse al desequilibrio entre las enzimas PG (en su forma endo) y pectinmetilesterasa (PME). Durante la maduración normal de los frutos las pectinas son degradadas, lo cual contribuye a cambios de textura como el ablandamiento y la liberación de jugo. Esta degradación ocurre por la acción las enzimas PME que cataliza la demetilación de las pectinas y la endoPG que reduce a menor tamaño las pectinas demetiladas en una reacción de despolimerización. Las bajas temperaturas reducen la actividad de la endo-PG lo cual causa una acumulación de pectinas demetiladas de alto peso molecular que retienen al agua libre formando geles (Artés et al. 1996, 1998). En melocotón, la falta de jugo en la harinosidad se debe a la retención del agua en forma de geles y no a la pérdida de agua por deshidratación. (Artés et al. 1998; Infante et al. 2008; Zhu et al. 2010).

En tomate se ha establecido una correlación entre harinosidad y un pericarpio espesor formado por células alargadas (Chaib et al. 2007). La harinosidad se ha

reportado como un síntoma de daños por frío en tomate con algunos aspectos que son similares a los que se asocian con el desarrollo de harinosidad en frutos de melocotón (Rugkonga et al. 2010).

En manzana, la harinosidad se asocia con una resistencia relativamente alta a la ruptura celular pero una baja adhesión entre células vecinas por disolución de sustancias pecticas en la lámina media, seguida de la separación celular (Nara et al. 2001).

Sin embargo, los resultados obtenidos en melón indican que el desarrollo de la harinosidad de la pulpa no requiere de bajas temperaturas, tal como ocurre en ciertos cultivares de melocotón. Este hecho puede arrojar luz sobre la controversia relativa a la exigencia o no de la refrigeración para provocar harinosidad en melocotón (Fernández-Trujillo et al. 2008).

3.4.4 Textura y degradación de la pared celular.

Los estudios realizados en especies modelo como el tomate, fresa o melón han aportado una cantidad significativa de información sobre la textura y los cambios que se producen durante la maduración. Sin embargo, los resultados obtenidos en otras especies y cultivares sugieren que existen diferencias en las que se debe hacer hincapié y tratar por separado. Lo que ocurre en una especie no se puede trasladar necesariamente a otra (Goulao et al. 2010).

Antes de la maduración, la fruta presenta una estructura rígida, ordenada y con estructuras celulares bien definidas, sin embargo durante la maduración, la fruta experimenta una serie de modificaciones en la estructura de la pared celular que afectan a la textura. La maduración de los frutos se caracteriza por la pérdida de firmeza de la pulpa (Wakabayashi 2000) y la textura es uno de los parámetros de mayor importancia para la calidad de productos vegetales como el melón siendo la pared celular es uno de los componentes que más afecta a sus características (Rodríguez et al. 2004), aunque no el único (Vicente et al. 2007). La celulosa, la hemicelulosa y las pectinas son los compuestos de la pared celular cuya su cuantificación son indicativos de la evolución de la maduración (Villanueva et al. 2004).

Estos cambios en la pared celular son el resultado principalmente de la acción de enzimas hidrolíticas sobre sus componentes hidrocarbonados, contribuyendo con ello al ablandamiento y pérdida de firmeza, incremento de la susceptibilidad a patógenos y deterioro del tejido de los frutos con una textura indeseable para los consumidores y

limitando su manejo poscosecha y vida útil (Bennett 2002; Brownleader et al. 1999; Brummell y Harpester, 2001; Goulao et al. 2010; Nishiyama et al. 2007; Prasanna et al. 2007). La biosíntesis y percepción de etileno juega un papel importante en el mantenimiento de la firmeza de los tejidos y en la extensión de la vida útil de la fruta (Obando-Ulloa et al. 2009c).

Los cambios de la pared celular asociados con ablandamiento de los frutos durante la maduración se pueden dividir en dos etapas secuenciales. La primera se produce en la maduración temprana de la fruta y se asocia con el desmontaje de los polímeros de xiloglucanos por la acción de hidrolasas de la pared celular y, sobre todo por la proteína expansina. La segunda etapa tiene lugar en la etapa tardía de maduración y está relacionada con el desmontaje de la red de pectina (Bennett 2002).

El conocimiento de la desorganización de la pared celular durante el desarrollo madurativo, ha resultado de gran importancia para proporcionar ideas acerca de los procesos involucrados en el ablandamiento de frutos, tanto climatéricos como no climatéricos y a su vez su relación con los procesos regulados por la acción del etileno. (Bennett y Labavitch, 2008). En frutos climatéricos, cuya textura se altera considerablemente durante la maduración, una pérdida máxima de firmeza se relaciona directamente con un rápido aumento de la poligalacturonasa que está directamente estimulada por la biosíntesis de etileno (Prasanna et al. 2007).

3.4.5 Enzimas de degradación de la pared celular.

Entre las hidrolasas de la pared celular, las enzimas que degradan la pectina son las principales implicadas en el ablandamiento de los frutos. PG, PME, pectato liasa (PL) y β -Gal son las principales enzimas implicadas en las modificaciones y desmantelamiento de las pectinas (Bennett 2002; Prasanna et al. 2007).

3.4.5.1 Poligalacturonasas.

Las PGs (poliglicanohidrolasas (1 \rightarrow 4- α -D-galacturónico)) son enzimas de tipo exo ó endo que catalizan la ruptura hidrolítica de las uniones de GalA. El tipo exo (CE 3.2.1.77) elimina solo unidades de GalA desde el extremo no reductor del ácido poligalacturónico, mientras que el tipo endo (EC 3.2.1.15) es la PG específica de la maduración del fruto siendo la responsable de la despolimerización y solubilización de poliurónidos y escinde tales polímeros al azar. No obstante, ambos tipos de esta enzima

(exo y endo) se encuentran presentes en fruta. (Flores et al. 2001, 2008; Wakasa et al. 2006).

El principal sustrato de la PG son los HGs que se encuentran en la pared en una forma altamente metil-esterificada que debe ser de-esterificada para convertirse en un sustrato disponible para la PG. Un aumento en la actividad de la PG ha sido asociado a la maduración de los frutos, aunque la cantidad detectada varía ampliamente según las especies (Brummell y Harpster, 2001). La endo PG degrada los HGs puros a series homólogas de enlaces simples (1→4) de oligo- α -D-galacturónidos (Dumville y Fry, 2000). La expresión de los genes de PG que actúan en la degradación de la pared celular y la pérdida de semi-permeabilidad de las membranas celulares en la maduración, tiene componentes, tanto dependientes como independientes de la acción del etileno (Flores et al. 2001, 2008; Wakasa et al. 2006).

3.4.5.2 Pectinmetilesterasas.

La PME es una enzima específica para ésteres de galacturónidos y actúa eliminando los grupos metoxilo de la posición C6 de residuos de GalA de la pectina de alto peso molecular durante la maduración del fruto por ataque nucleofílico (Brummell y Harpster, 2001; Manrique y Lajolo, 2004; Prasanna et al. 2007:).

La PME no actúa rompiendo la columna vertebral de los HGs pero desesterifica parcialmente las pectinas metil-esterificadas en sustratos disponibles para la PG y llevar a cabo la despolimerización extensa de poliurónidos (Wakabayashi, 2000). Esta enzima contribuye también a la expansión de las células, así como a la maduración asociada al desmontaje de la pared celular. La acción de la PME ha sido estudiada en muchos frutos climatéricos, teniendo un papel importante en los cambios de la pared celular durante la maduración (Bennett y Labavitch, 2008; Brownleader et al. 1999).

3.4.5.3 Pectato liasas.

Esta enzima cataliza la ruptura de las unidades de-esterificadas o esterificadas de galacturonato por una trans β eliminación de hidrógeno a partir de las posiciones C-4 y C-5 de GalA. La exo-PL (EC 4.2.2.9) actúa desde el extremo no reductor, mientras que endo-PL (EC 4.2.2.2) actúa de forma aleatoria en galacturonanos de-esterificados (Prasanna et al. 2007). La actividad de la PL y sus genes ha sido detectada en muchas especies de plantas, a menudo incluyendo secuencias que son expresadas específicamente en frutas. En frutos climatéricos como el tomate se ha detectado la

expresión de genes PL durante la maduración. En la fresa, un fruto no climatérico la supresión de la expresión génica de PL dio como resultado frutos más firmes y con menor hinchazón de la pared celular (Bennett y Labavitch, 2008; Vicente et al. 2007).

3.4.5.4 β -Galactosidasas.

La β -Gal (EC 3.2.1.23) es una glucosidasa que actúa sobre oligómeros de cadena corta de las unidades de galactosa. Esta enzima degrada parcialmente los componentes pécticos y la hemicelulosa de la pared celular y posiblemente está relacionado con el desglose de los polisacáridos en la sobremaduración del fruto. La β -Gal y un incremento de su actividad durante la maduración ha sido detectada en una amplia variedad de frutas. En melón, esta enzima es capaz de atacar polímeros nativos de galactano (Prasanna et al. 2007). El papel de esta enzima en el desmantelamiento de la pectina puede ser similar al desempeñado por la PME, favoreciendo la acción de la PG y la PL sobre el esqueleto de componentes pécticos más complejos como los RGs I y II (Bennett y Labavitch, 2008). La pérdida de galactanos se ha demostrado que acompaña o precede incluso el incremento en la solubilización de poliuronidos. La β -Gal purificada cataliza una aparente disminución en el tamaño molecular de las pectinas in vitro en frutos de melón (Rose et al. 1998).

3.4.5.5 Xiloglucano endotransglicosilasas. Hidrolasas.

Estas enzimas se cree que participan en la maduración regulada de la hemicelulosa y específicamente en el desmontaje de xiloglucano. Estas enzimas actúan rompiendo los enlaces internos glucano β -1,4 del xiloglucano y pueden transferir el producto de la división a otro polímero de xiloglucano u oligosacáridos (Bennett y Labavitch, 2008; Brummell y Harpster, 2001).

3.4.5.6 Expansinas.

Las expansinas (EXPs) son proteínas modificadoras de la pared celular que actúan cooperativamente con la PG para desmontar las redes de polímeros y contribuir así al ablandamiento de las frutas. Mientras que la participación de la PG y la EXP en la maduración asociada al metabolismo de la pared es clara, poco se sabe poco acerca del modo en que interactúan en el desmantelamiento de la pared celular (Cantú et al. 2007). Las EXP parecen jugar un papel en el desensamblaje de la matriz hemicelulósica en la maduración de las frutas y se cree que la función de la EXP es influir en las

interacciones dentro de la red celulosa-hemicelulosa y pueden contribuir a cambios en esta región de la pared celular incrementando potencialmente la accesibilidad a los xiloglucanos para el ataque enzimático (Bennett 2002; Salentijn et al. 2003). Las EXP parecen funcionar mediante la interrupción de puentes de hidrógeno entre los polímeros de la pared celular en vez de mediante fragmentación de los polímeros (Bennett y Labavitch, 2008). En tomate, una supresión transgénica de una EXP relacionada con la maduración resultó en una reducida despolimerización de poliuronidos al final de la maduración. Esto sugiere que un incremento en la accesibilidad de la PG a los HGs puede ser un componente clave en los cambios de la pared celular durante la maduración (Brummell 2006).

3.4.5.7 Otras enzimas.

El silenciamiento de la actividad de enzimas del metabolismo de carbohidratos que producen la formación de n-glicanos libres en el pericarpo de tomate como la alfa-manosidasa y la β -D-N-acetilhexosaminidasa (beta-hex) produce un aumento de firmeza del pericarpo del fruto y un aumento de la vida comercial (Meli et al. 2010). La expresión de los genes que codifican para dichas enzimas depende del etileno y están moduladas por el gen rin. Sin embargo, el hecho de que algo similar se haya encontrado en pimiento (Ghosh et al. 2011), induce a pensar en una acción mucho más general de estas enzimas sobre la textura aún desconocida.

3.5 Etileno y firmeza.

Durante la maduración tienen lugar cambios en la expresión génica que suponen la aparición de nuevos ARNm, ARNt, ARNr, y poli A⁺ARN específicos de la maduración y proteínas, la desaparición de algunos ARNm y la constancia de otros. Estos cambios durante la maduración del fruto se activan por las hormonas de las plantas (Prasanna et al. 2007).

El etileno, es una hormona vegetal cuyo papel en los procesos madurativos de frutos climatéricos ha sido ampliamente estudiado, con procesos tanto dependientes como independientes de la acción de etileno (Flores et al. 2001, 2008). Durante el ablandamiento de los tejidos con la maduración coexisten ambos tipos de procesos (dependientes e independientes), siendo el papel de esta hormona clave en la maduración de frutos climatéricos (Flores et al. 2001; Obando et al. 2009). En frutos

climatericos de melocotón, pera y de melón tipo *Charentais* se ha señalado un incremento de ablandamiento durante la maduración por el etileno como consecuencia del el aumento de la actividad de enzimas hidrolíticas de la pared celular (Li et al. 2011).

En melón, su rápido ablandamiento a menudo correlaciona con una producción autocatalítica de etileno y degradación de los polímeros de la pared celular (Nishizawa et al. 2009).

La regulación de los niveles de etileno en las frutas y una comprensión de cómo esta hormona señala el inicio de la maduración son importantes consideraciones en la regulación de la maduración y mejorar la textura del fruto (Brownleader et al. 1999). Estudios de genómica han revelado que una gran parte de los genes relacionados con la maduración (aproximadamente el 40%) dependen de etileno, siendo este un potenciador que actúa como intermediario de una cadena de reguladores relacionados entre sí (Page et al. 2008)

Debido a que la maduración y el ablandamiento de frutos climaterios es controlada por la síntesis de etileno endógeno, se ha presumido que la expresión de los genes que codifican las la proteínas modificadoras de la pared celular que regulan la maduración es etileno-regulada. Sin embargo no siempre está claro si los genes que codifican la acción de estas proteínas son regulados directamente por el etileno o por otras señales asociadas a la maduración (Bennett y Labavitch, 2008).

En albaricoque, un fruto climaterico, la reducción en la firmeza de la fruta como resultado de una inhibición del etileno, sugiere su participación como regulador de los procesos que definen este atributo (Valdés et al. 2009). En otro fruto climaterico como el melocotón, los resultados obtenidos en diferentes genotipos estudiados (con carne dura o blanda) indicaron que la producción de etileno pueden no estar directamente relacionada con los cambios de firmeza de la pulpa durante la maduración, siendo más probable es una característica cultivar-dependiente (Manganaris et al. 2006).

En melones climatericos, algunos cultivares mostraron una disminución muy rápida en la firmeza de la pulpa durante la maduración, limitando su transporte, almacenamiento y conservación (Nishiyama et al. 2007). La firmeza de los frutos y la textura afectan a la integridad de las fruta, y la textura es desde el punto de vista del consumidor el atributo principal de cualidad de la aceptación en el mercado (Goulao y Oliveira, 2008). La expresión de genes de PGs que actúan degradando la pared celular y

la pérdida de semipermeabilidad de las membranas celulares durante la maduración tienen componentes dependientes e independientes del etileno y de esta observación, se dedujo la presencia de los dos sistemas regulatorios en el ablandamiento de la fruta (Flores et al. 2001). Un rápido aumento en la actividad de la PG suele acompañar a la maduración normal en muchas frutas (Prasanna et al. 2007). No obstante, en melón, se ha detectado la liberación de poliuronidos incluso en ausencia de la actividad de endo-PG (Goulao et al. 2010).

Un estudio con melones tipo ‘Hami’ dio como resultado que la actividad de las enzimas PME, PG, β -glucanasa y β -GAL fue menor en melones tratados con 1-MCP que en los controles. Por lo tanto, la menor actividad de estas enzimas de la pared celular fue responsable de la inhibición de la degradación de pectina y hemicelulosa, dando como resultado un retraso en el ablandamiento de los frutos de melón ‘Hami’. En conclusión, el empleo de 1-MCP retrasó y disminuyó el pico de producción de etileno mediante la reducción de las actividades de las enzimas de la biosíntesis de etileno y con ello previno el proceso de ablandamiento de la pulpa de melón (Li et al. 2011).

3.6 Otros componentes que afectan a la firmeza de la fruta.

Las propiedades mecánicas de los tejidos vegetales afectan a las modificaciones de composición y estructura de la pared celular (Waldron et al. 2003). Las alteraciones de la pared celular implican cambios en la firmeza e hidratación de la pared, en la permeabilidad de la membrana, con descenso de la integridad de la pared e incremento de los espacios intercelulares (Tucker y Grierson, 1987). Estudios realizados en frutos de tomate con un mínimo ablandamiento con la maduración DFD “delayed fruit deterioration”, demostraron que la pérdida de firmeza es el resultado de múltiples procesos coordinados, así como de sus tiempos. Además del desmantelamiento de las redes de polisacáridos en la pared celular primaria y la lámina media por la acción enzimática y de las proteínas modificadoras de pared, la pérdida de agua por transpiración y la pérdida de turgencia celular juegan un papel muy importante en algunos frutos, especialmente las denominadas bayas.

Del mismo modo, estos estudios han demostrado que la cutícula también desempeña un papel importante sobre las propiedades mecánicas de los tejidos. La influencia de la cutícula (Fig. 7) sobre la firmeza de la frutos de tomate se debió de forma directa a sus

propiedades estructurales e indirectamente a su capacidad de actuar como barrera primaria sobre la pérdida de agua (Saladié et al. 2007). La pérdida de firmeza es a menudo acompañada de una pérdida de turgor celular debido al aumento de las concentraciones de solutos en el espacio de la pared celular y al debilitamiento de la pared (Brummell y Harpster, 2001; Rojas et al. 2001).

La regulación de la transpiración de agua en frutos maduros puede representar una importante estrategia para prolongar la firmeza de la fruta. En tomate, una disminución en la turgencia celular más o menos en paralelo fue observada a la pérdida de firmeza asociada a la maduración. Tomates mutantes con una vida útil más larga, mantenimiento de la firmeza y de la textura y resistencia frente a la infección por patógenos poscosecha, experimentaron los mismos procesos de degradación de la pared que frutos con un proceso normal de ablandamiento. Sin embargo, los niveles altos de turgor celular en los frutos mutantes frente a los no mutantes apoyan la hipótesis de que el desmontaje de la pared celular no es la única causa de ablandamiento (Vicente et al. 2007).

Los principales cambios que ocurren durante la degradación de la pared celular y que afectan a la firmeza de los frutos son la pérdida de turgor junto con la disolución de la lámina media seguida de la disrupción de la estructura de la pared celular primaria (Brummell 2006), si bien la contribución relativa de cada evento en la maduración no está clara y probablemente depende de la especie (Goulao et al. 2010).

Otras modificaciones que acompañan a los frutos durante la maduración son cambios en los pigmentos, la biosíntesis de aromas, el incremento de ácidos orgánicos, azúcares y de las concentraciones de algunos iones y la disminución del pH en el espacio de la pared o en el espacio extracelular periférico al plasmalema de las células vegetales denominado apoplasto (Almeida y Huber, 1999; Brummell 2006; Brummell y Harpster, 2001; Prasanna et al. 2007).

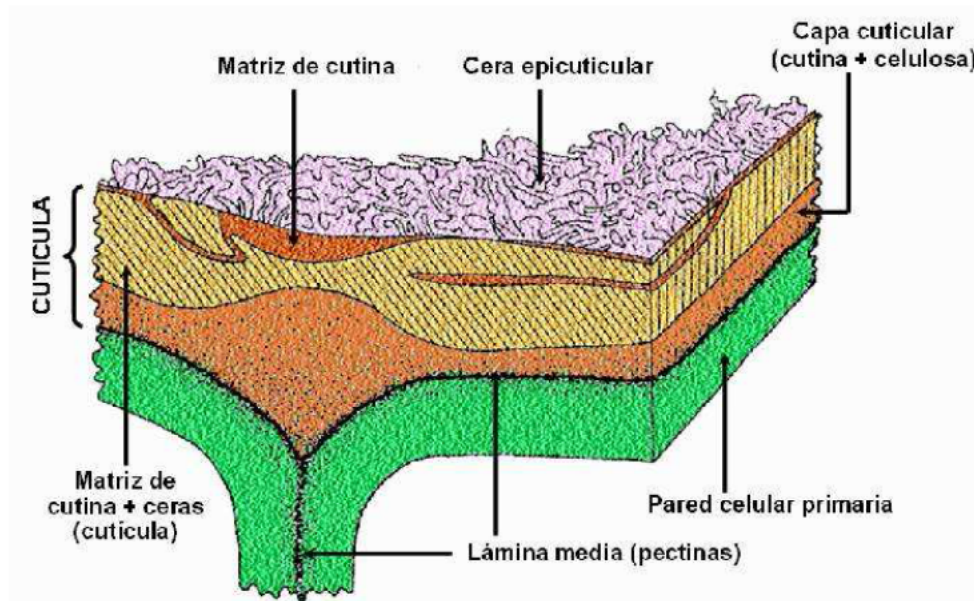


Figura 7. Componentes de la cutícula y su relación con los componentes de la pared celular. www.euita.upv.es/varios/biologia/Temas/tema_5.htm

3.7 QTLs y firmeza.

La existencia de variedades de melón con comportamiento climatérico y no climatérico hace de esta especie un sistema adecuado para estudiar el control genético en la maduración del climaterio y los QTLs involucrados en este proceso. Algunos de los resultados obtenidos están publicados en Moreno et al. (2008). No obstante, el estudio de QTLs es un procedimiento extendido a otras especies y supone un ejemplo de cómo el incremento del conocimiento genético y más concretamente de segmentos de genes asociados a parámetros de calidad puede ayudar a generar frutos con mejores características tanto para los consumidores como para el mercado como por ejemplo el tomate o la fresa. Ambos frutos presentan un claro deterioro de la textura que suele ir en paralelo al aumento del micelio gris provocado por el hongo *Botrytis cinerea* (Cantu et al. 2008; Jiménez-Bermúdez et al. 2002; Salentijn et al. 2003).

El tomate es un fruto climatérico sobre el que se investigado mucho en los últimos años en relación a los genes y encontrar QTLs relacionados con la textura y con los procesos de ablandamiento durante su maduración (Causse et al. 2002; Page et al. 2008; Saladié et al. 2007), Causse et al. (2001) identificó QTLs en los cromosomas de tomate 2 (TG484), 5 (CT093, TG318), 9 (H35M51-176C) y 11 (TG046) relacionados con la firmeza de la pulpa del tomate en recolección. La firmeza fue medida por un grupo de

panelistas entrenados y tuvo un alto porcentaje de variación por el efecto de la línea y relativamente bajo por efecto del panel.

Los parámetros de textura son muy difíciles de relacionar con medidas físicas, aunque la firmeza del tomate en boca está en parte relacionada con la medida instrumental de la firmeza de la fruta. La mejora de la vida comercial del tomate se obtuvo por el uso de una mutación *rin* o por el efecto acumulativo de varios genes mejorando la firmeza de la fruta (Causse et al. 2003)

En un estudio reciente con NILs de tomate introgresionadas con QTLs se ha identificado una posible implicación de una región específica en el cromosoma 9 para la regulación del metabolismo de la galactosa en la pared celular. No obstante, se debe continuar avanzando en el estudio del efecto que tienen los polisacáridos de la pared celular sobre las propiedades mecánicas de los tejidos (Lahaye et al. 2012).

En fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.), una fruta no climatérica, se han identificado 10 genes que pueden estar asociados con el metabolismo de la pared celular. Se han desarrollado líneas de fresa transgénicas con inhibiciones antisentido de estos genes y ello ha demostrado la importancia de los genes del metabolismo en el ablandamiento y otras propiedades del fruto (Posé et al. 2013; Sesmero et al. 2007) Se encontraron diferencias sustanciales en la expresión genética de la firmeza en los cultivares de fresa. En los frutos maduros del cultivar blando, estuvieron incrementados varios genes posiblemente implicados en la degradación de la pared celular como los genes de PME (H163 y B8) y PG (B4). La diferencia más pronunciada entre ambos cultivares se observó en los genes que codifican enzimas que intervienen en la biosíntesis de la lignina que es una rama de la vía de fenilpropanoides (alcohol deshidrogenasa cinámico CAD y cinámico CoA reductasa, CCR) (Salentijn et al. 2003). En numerosas líneas independientes de fresa transgénica la inhibición de la enzima PL dio como resultado una mayor firmeza de los frutos de fresa maduros y un menor ablandamiento post-cosecha, sin afectar a otros atributos de calidad. Este hecho se produjo probablemente debido a la baja solubilidad de la pectina. Este gen es un excelente candidato para el mejoramiento biotecnológico de ablandamiento de los frutos de fresa (Jiménez-Bermúdez et al. 2002).

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población experimental.

Las líneas casi-isogénicas o NILs de melón han sido ampliamente descritas (Eduardo et al. 2005; Moreno et al. 2008; Obando et al. 2008) y se desarrollaron en el Laboratorio de Genética Molecular Vegetal del IRTA-CRAG (Barcelona, España) a partir del cruzamiento de dos parentales no climatéricos, el melón español *Cucumis melo* L. cultivar ‘Piel de Sapo’ T111 (PS) y un melón del tipo Agrestes de la accesión exótica coreana PI 161375 ‘Shongwan Charmi’ (SC). Se desarrolló una genoteca de NILs de melón de manera cada NIL contiene una introgresión casi única en la mayoría de los casos del donante silvestre (SC) en el entorno genético del cultivar (PS). Las NILs presentaron distinto comportamiento fisiológico y se han empleado para identificar QTLs o alelos de genes asociados a atributos de calidad del melón (Monforte et al. 2002). La línea casi-isogénica SC3-5-1 contiene introgresiones en homocigosis de la accesión coreana PI 161375 en el fondo genético del parental ‘Piel de Sapo’ T111 en los cromosomas III y VI que por sí solas o en conjunto dan un fenotipo climatérico (Vegas et al. 2013). Las líneas SC7-1, SC7-2 y SC10-2 fueron desarrolladas inicialmente por Eduardo et al. (2005) y contienen introgresiones en homocigosis (el 2 en las Fig. 1 y 2) en los cromosomas VII (Fig. 1) o X (Fig. 2).

<i>NILs</i>	CMAGN75	CM ^{new}	CMAGN30	CMGAN21	CM ^{new} 2
SC7-1	2				
SC7-2	2	2	2	2	

Figura 1. Genotipo gráfico de NILs con introgresión en el grupo de ligamiento VII (Eduardo et al. 2005).

<i>NILs</i>	NR71	TJ86	TJ78	*CSWCT01	NR67	*CMGA172	CMnew4	*CMT134B	*CMGA165	NR8
SC10-2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2

Figura 2. Genotipo gráfico de NILs con introgresión en el grupo de ligamiento X de melón (Eduardo et al. 2005).

2. Condiciones climáticas.

Las condiciones climáticas fueron medidas en la estación meteorológica de CIFEA en Torre Pacheco (Murcia) desde el trasplante de las plántulas a campo abierto (abril) hasta la recolección de los frutos (julio).

En 2006, las temperaturas medias oscilaron entre 17,9°C (en abril) y 27,8°C (en julio). La temperatura media global estuvo en torno a 22,4°C. La evaporación media fue de 25,3 mm·m⁻² (pico mínimo de 17,2 mm·m⁻² en abril), con un valor medio mínimo en mayo de 21,0 mm·m⁻² y máximo en julio de 30,1 mm·m⁻². Las precipitaciones mensuales fueron 44,7 mm en abril, 27 mm en mayo, 1,3 mm en junio y sin precipitaciones en julio. El total de días con precipitaciones fue de 13, con un pico máximo de 27,5 mm el 17 abril.

En 2008, las temperaturas medias oscilaron entre 15,9°C (en abril) y 26,3°C (en julio). La temperatura media global estuvo en torno a 20,9°C. La evaporación media fue de 25,3 mm·m⁻², con un valor medio mínimo en mayo de 21,3 mm·m⁻² (pico mínimo de 12,24 mm·m⁻²) y máximo en julio de 29,0 mm·m⁻². Las precipitaciones mensuales fueron 61,0 mm en mayo, 1,4 mm en junio y 5,5 mm en julio. Sin precipitaciones en el mes de abril. El total de días con precipitaciones fue de 14, con un pico máximo de 27,5 mm el 8 de mayo.

En 2009, las temperaturas medias oscilaron entre 16,0°C (en abril) y 28,3°C (en julio). La temperatura media global estuvo en torno a 22,6°C. La evaporación media fue de 25,3 mm·m⁻², con un valor medio mínimo en abril de 16,5 mm·m⁻² (pico mínimo de 9,1 mm·m⁻²) y máximo en julio de 32,1 mm·m⁻². Las precipitaciones mensuales fueron 22,5 mm en abril y 6,3 mm en junio. Sin precipitaciones en los meses de junio y julio. El total de días con precipitaciones fue de 8, con un pico máximo de 13,4 mm el 19 de abril.

3. Preparación del campo y siembra.

El manejo del cultivo, las prácticas de cosecha y de los índices de recolección han sido previamente descritos (Fernández-Trujillo et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009; Fig. 3). La preparación del suelo, fertirrigación, fitosanitarios, control de malezas, y otras prácticas de cultivo fueron los que suelen utilizarse para el cultivo de melón en las condiciones del Mediterráneo en Torre Pacheco (Murcia, España) (Obando-Ulloa et al. 2008). El suelo de la parcela estuvo localizado en el CIFEA (Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias) y fue clasificado como calcisol háplico. Las dimensiones del terreno fueron 42 m de largo x 40 m de ancho en 2006 y 50 m de largo x 42 m de ancho en 2008 y 2009. El marco de plantación fue de 2 x 1. El campo estuvo dividido en 12 líneas.

3.1 Siembra y riego.

A finales de febrero y principios de marzo se realizó la siembra en semillero y se distribuyó la materia orgánica, $1,5 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ mezcla de gallinaza y vacuno con pase de fresadora para mezclar con el suelo. En abril se procedió al corte del terreno en mesetas para melón, colocación del riego localizado a goteo y del acolchado con polietileno transparente (80-90 galgas de espesor y 1,1 m de ancho). Se trató con un herbicida selectivo (Oxifluorfen) de pre y post emergencia temprana que actúa sobre los tejidos meristémicos foliares con acción de contacto preventivo, a una dosis de $750 \text{ cm}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$. En abril (6, 7 y 17 de abril de 2006, 2008 y 2009 respectivamente) y previa colocación de una manta térmica sobre el terreno y marcaje de campo con tablillas según diseño de plantación, las plántulas en la fase de dos hojas verdaderas se establecieron en un campo abierto transcurridos 36 días en 2006 y aproximadamente 45 días en 2008 y 2009 desde de la siembra. En mayo tuvo lugar la floración de las flores femeninas y la detección de los primeros cuajes en campo. En 2008 hubo un cuajado deficiente como resultado de problemas climatológicos (exceso de precipitaciones y bajas temperaturas). En mayo y junio se eliminaron manualmente las malas hierbas. En junio realizó el marcaje en campo de los frutos individualmente. Por último se procedió a la retirada de la manta térmica a los 40-50 días de su colocación.

Para el riego se empleó una manga de riego de 16 mm con goteros integrados a 33 cm de $2 \text{ L} \cdot \text{h}^{-1}$ colocando la planta a una distancia aproximada del gotero de 10 cm.



Figura 3. a) Colocación de la manta térmica sobre el terreno. b) Disposición de una plántula de NIL de melón (8M8-3) según previo diseño de plantación y marcaje de campo y acolchado. c) Distribución de las plántulas y señalización del campo con tablillas en la campaña 2008. Fotografía tomada por Fernández-Trujillo en el CIFEA.

3.2 Tratamientos.

- En 2006 (19 de mayo) se realizó un tratamiento con Imidacloprid 20% p/v SL (Confidor 20 LS, Bayer CropScience, Valencia, España), un concentrado soluble para aplicar en pulverización foliar o diluido en el agua de riego para el control de pulgones. La dosis fue $50-75 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$ según indicaciones del fabricante. La principal enfermedad que afectó a las plantas en esta campaña fue oídio.

▪ En 2008 se realizaron cinco tratamientos con fungicidas e insecticidas entre los meses de junio y julio siguiendo las indicaciones de los fabricantes. 2 de Junio, Imidacloprid 20% p/v SL (Confidor 20 LS, Bayer CropScience, Valencia, España; Couraze, Agrodán, Almansa, Madrid, España; Kohinor, Aragonesas Agro S.A. (Aragro), Madrid, España), dosis $50-75 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$. Azoxistrobin 25% p/v SC (Ortica, Syngenta Agro S.A., Madrid, España) es una suspensión concentrada para aplicar en pulverización foliar para el control de mildiu y oídio, dosis $75-80 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$. 13 de Junio, Triflumizol 30% WP (Trifmine 30 WP EX, Sipcam Inagra S.A., Valencia, España), polvo mojable para aplicar en pulverización foliar contra oídios, dosis $80 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$. Cimoxanilo 2,67% + Fosetil-al 33,3% + Mancozeb 33,3% WG (Almanach, Bayer CropScience, España) es una triple asociación de fungicidas presentada en forma de granulado dispersable en agua para aplicar en pulverización foliar el control preventivo de mildiu, dosis $3,5-4,5 \text{ kg} \cdot \text{ha}^{-1}$. 23 de Junio, Fenarimol 12% p/v SC (Rubigan Flow, Gowan Company LLC., Arizona, EE.UU), suspensión concentrada para aplicar en pulverización foliar en control de oídios, dosis $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$. Piridaben 20%. WP (Sanmite, BASF Española, S.L., Barcelona, España), polvo mojable para aplicar en pulverización foliar en el control de mosca blanca y larvas y adultos de araña roja, dosis $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{hl}^{-1}$. 2 de julio, se repite el tratamiento con Imidacloprid 20% p/v y Azoxistrobin 25% p/v SC. 7 de julio, se repite el tratamiento con Triflumizol 30% WP.

La solución nutriente para fertirrigación estuvo compuesta por ácido nítrico ácido fosfórico, nitrato cálcico, nitrato amónico, nitrato potásico, sulfato potásico, fosfato monoamónico y nitrato magnésico a distintas concentraciones. Se efectuaron 26 riegos durante 70 h con 3 goteros a $2 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$, para un total de $4200 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$.

Tabla 1. Solución nutriente utilizada durante la campaña 2008.

Compuesto	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Mg	Ca
A. Nítrico	9				
A. Fosfórico		11			
N. Cálcico	19				33
N. Amónico	25				
N. Potásico	24		83		
S. Potásico			65		
F. Monoamónico	6	30			
N. Magnesio	7			10	
UF/Ha	90	41	148	10	33

UF/Ha Unidades fertilizantes por hectárea.

▪ En 2009 se efectuaron tres tratamientos con fungicidas e insecticidas entre los meses de mayo y junio según indicaciones de los fabricantes. 19 de junio, Azufre micronizado 80% (Cepsul, Cepsa (Cia. Española Petroleos), S.A. Madrid, España), para el tratamiento de araña roja y oidio. Maneb 10% (Belpron M10, Probelte, Murcia, España) para el tratamiento de mildiu. 10 de junio, se repite el tratamiento anterior más Cipermetrin 0,5% (Cipemor, Agrimor, S.A., Madrid, España) para tratar oruga y pulgón. 24 de abril, se repite el tratamiento anterior. Las plantas de la línea parental SC sufrieron de *Fusarium sp.* en sus raíces.

La solución nutriente para fertirrigación estuvo compuesta por ácido nítrico, nitrato cálcico, nitrato amónico, nitrato potásico, sulfato potásico y fosfato monoamónico a distintas concentraciones. Se efectuaron 27 riegos durante 68 h con 3 goteros a $2 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$, para un total de $4080 \text{ m}^3 \cdot \text{ha}^{-1}$.

Tabla 2. Solución nutriente utilizada durante la campaña de melón 2009.

Compuesto	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca
A. Nítrico	8			
N. Cálcico	18			31
N. Amónico	15			
N. Potásico	27		95	
S. Potásico			40	
F. Monoamónico	12	61		
UF/Ha	80	61	135	31

UF/Ha Unidades fertilizantes por hectárea.

4. Diseño experimental.

Se siguió un diseño experimental completamente aleatorizado descrito en Obando et al. (2008). El campo fue dividido en bloques en un diseño completamente al azar dentro del bloque. En cada bloque los números de réplica de cada línea fueron aproximadamente los mismos para facilitar la recolección. Por ejemplo, en el bloque 1, réplicas 1. La plantación fue rodeada por una línea borde de la variedad ‘Nicolás’.

En la campaña 2006, la experiencia constó de 16 líneas codificadas según tabla 3 y que se identifican con la siguiente terminología: 6Mx-y z, donde x es la línea, y es la réplica y z el fruto. M es la inicial de lugar de cultivo (Murcia) y el número 6 el año de la campaña (2006). Los códigos del experimento principal fueron: 6M1 a 6M10 y PS (6M11) como control y otras NILs codificadas como 6M17 a 6M19 como referencia.

Las líneas plantadas y sus réplicas fueron el parental PS, n=21, la NIL SC3-5 (6M10) y nueve líneas casi-isogénicas más n=7, excepto 6M2, n=5 y 6M8 y 6M9, n=9, un control de híbrido tipo ‘Piel de Sapo’ variedad ‘Nicolás’, n=7, el parental *C. melo* var. *cantalupensis* Naud, cultivar ‘Védrantais’ habitualmente utilizado por Vilmorin en Francia, n=7, y tres líneas casi-isogénicas más de la colección de NILs (Eduardo et al. 2005): 6M17 similar a SC6-4, n=1; 6M18 ó SC10-2, n=3 y 6M19 ó SC7-1, n=5. La línea 6M10 se corresponde a la línea SC3-5 ensayada con anterioridad. Cada réplica constó de tres plantas (líneas 6M1, 6M3 a 6M15), dos (6M2, 6M17), o dos ó tres plantas (6M18 y 6M19), en los dos últimos casos por mortandad de plantas en el semillero. Para el experimento de calidad el número de frutos por réplica fue de dos (codificados como A o B) para un total de 263 muestras o frutos. Si se recolectaban frutos de inmadurez o sobremadurez evidente, se tomaban muestras adicionales (codificadas con letras sucesivas como C, D, ó E) descartando las anteriores que no cumplieran las especificaciones de madurez (Dos-Santos et al. 2007).

Tabla 3. Codificación de las líneas cultivadas en la campaña 2006 (6M1 a 6M10, NILs del experimento principal). Las de código SC son líneas casi isogénicas obtenidas por E. Moreno, A. Monforte y J. Garcia-Mas (datos no publicados).

Línea	Código
6M1	6M1
SC3-5-7	6M2
SC3-5-8	6M3
PS	6M5 ^z
SC3-5-9	6M4
SC3-5-11	6M6
SC3-5-12	6M7
SC3-5-13	6M8
SC3-5-14	6M9
6M10	6M10
PS cv T111	6M11
‘Nicolás’	6M14
‘Védrantais’	6M15
SC10-2	6M18
SC7-1	6M19

^z Este código en un re-análisis de las líneas resultó no tener introgresión en LG III o LG VI, por lo que se considera similar al parental ‘Piel de Sapo’ y se descartó de posteriores análisis (Monforte, com. personal).

Se describen aquí los experimentos de 2008 y 2009 con todas las codificaciones de líneas de ambas campañas. Sin embargo, sólo los resultados de algunas de ellas forman

parte de la presente tesis doctoral. En la campaña 2008 el experimento constó de 15 líneas (Tabla 4), con los siguientes códigos (8Mx-y z) para la experiencia principal, codificadas con los números 1 al 15: 8M1 a 8M10 y los parentales y PS cv. T111 (8M11) (control), y ‘Shongwhan Charmi’ entrada PI 161375 (SC, 8M12). Otras líneas codificadas como 8M2 (PI124112), 8M4 (Ginsen Makuwa) correspondieron a parentales exóticos, y 8M5 a un cultivar comercial tipo ‘Piel de Sapo’ (cv. Medellín) del grupo Inodorus. Cada réplica constó de tres plantas separadas 1,5 m de las filas (0,36 plantas·m²). La distancia entre repeticiones fue de 3 m. La separación entre filas fue de 2 m. Las líneas plantadas y sus réplicas fueron el parental PS cv T111 (8M11), n=21 y el parental coreano SC (8M12), n=10, n=7 para las NILs SC3-5-1 (8M1) y SC8-4 (8M10) y cuatro líneas casi-isogénicas más SC12-1 (8M6), SC7-2 (8M7), SC12-3 (8M8) y SC10-2 (8M9), n=6. Se plantaron también tres líneas correspondientes a parentales exóticos (8M2, 8M4, 8M5), n=6; un control de híbrido tipo Piel de Sapo variedad ‘Nicolás’ grupo Inodorus, n=6; el parental *C. melo* var. *cantalupensis* Naud, cultivar ‘Védrantais’, n=6; la variedad ‘Dulce’ n=6 y una línea casi-isogénica más de la colección de NILs, 8M17, n=1. Para el experimento de calidad el número de frutos por réplica fue de dos (A y B incluyendo C, D y E en el caso de ser necesario) para un total de 227 muestras o frutos. La línea 8M3 (*Cucumis trigonus*) quedó fuera del experimento por mortandad de las plantas.

Tabla 4. Codificación de las líneas cultivadas en la campañas de melón 2008 y 2009 (8M1, 8M5-8M10 y 9M1-9M10 NILs del experimento principal, respectivamente). Las de código SC son líneas casi isogénicas obtenidas por Eduardo et al. (2005).

Línea	Código	Línea	Código
SC3-5-1	8M1	SC3-5-1	9M1
PI124112	8M2	SC7-1	9M2
<i>Cucumis trigonus</i>	8M3	SC3-5-8	9M3
Ginsen Makuwa	8M4	SC5-4	9M4
‘Medellín’	8M5	SC3-5-12	9M5
SC12-1	8M6	SC3-5-3	9M6
SC7-2	8M7	SC7-2	9M7
SC12-3	8M8	SC3-5-14	9M8
SC10-2	8M9	SC10-2	9M9
SC8-4	8M10	SC3-5	9M10
PS	8M11	PS	9M11
PI 161375	8M12	PI 161375	9M12
‘Dulce’	8M13	‘Galia’	9M13
‘Nicolás’	8M14	‘Nicolás’	9M14
‘Védrantais’	8M15		

En la campaña 2009 el experimento constó de 14 líneas (tabla 4) con los siguientes códigos (9Mx-y z) para el experimento principal: 9M1 a 9M10 y los parentales SC (9M12) y PS cv T111 (9M11), este último como control. Cada réplica constó de seis plantas contiguas en de dos filas. La distancia entre repeticiones fue de 3 m. La separación entre filas fue de 2 m. Las líneas plantadas y sus réplicas fueron el parental PS cv T111 (9M11) empleado como control, n=9 y el parental coreano SC (9M12), n=6; para las NILs SC7-1 (9M2), SC3-5-8 (9M3), SC5-4 (9M4), SC3-5-12 (9M5=6M7) y SC3-5-3 (9M6=6M6), n=3; n=4 para SC3-5-14 (9M8=6M9) y SC10-2 (9M9=8M9); n=10 para SC3-5 (9M10=6M10) y n=7 para SC7-2 (9M7=8M7); n=6 para el control de híbrido tipo Piel de Sapo variedad ‘Nicolás’ (grupo Inodorus) y n=1 para el melón ‘Galia’ *Cucumis melo* var. *reticulatus*. Para el experimento de calidad el número de frutos por réplica fue de dos (A y B incluyendo C, D y E en el caso de ser necesario) para un total de 160 muestras o frutos

5. Cosecha

Los frutos fueron cosechados en 2-3 semanas del mes de Julio (del 20 Junio a 20 Julio en 2006, del 7 al 16 de julio en 2008 y del 8 al 27 de julio en 2009). La cosecha fue realizada por dos personas durante las primeras horas de la mañana (6:30-10:00 a.m.) de acuerdo con los índices de madurez descritos para estas líneas (Tijskens et al. 2009) dependiendo de su carácter climatérico o no climatérico. Para las variedades climatéricas es conveniente realizar una recolección diaria y marcar las plantas con frutos susceptibles de ser recolectados al día siguiente.

Los índices mínimos de cosecha fueron, un fruto sano, bien formado y libre de defectos, firme, con epidermis seca con el escriturado lignificado, alta densidad de acuerdo a la experiencia del cosechador, color de la piel, debilitamiento del tallo y de la hoja más cercana del pedúnculo suberificado de la fruta, y coloración amarillenta de la cama. Los índices de cosecha más comunes para el NILs no climatéricas y PS fueron el desarrollo de escriturado en la piel y a veces el desarrollo de anillos anulares, escriturado partiendo en zona radial de las proximidades del pedúnculo, o de color amarillo alrededor de la parte suberificada del pedúnculo. Para NILs climatéricas (dehiscentes de forma más o menos acelerada en el tiempo) los índices de cosecha, fueron el desarrollo y la dehiscencia de la fruta (aproximadamente 1/2 a 3/4 de grado de separación del pedúnculo o *slip* en la cosecha), la textura del fruto entero y la textura estilar final, coloración amarillenta de la piel (incluyendo la de la zona de la cama), las

fisuras o grietas en el historial de cada NIL, y la emisión de volátiles detectado por la nariz humana (Obando-Ulloa et al. 2009).

Las principales pérdidas en la cosecha se debieron a rajado de los frutos, escaldadura solar, sobremaduración y daños causados por animales (ratas, conejos y pájaros).

Una vez recolectados, los frutos se cargaron en cajas de polietileno evitando la sobrecarga de las mismas y los golpes y roces que pudieran dañar los frutos. Las cajas con frutos se transportaron en furgoneta hasta la Planta Piloto de Tecnología de los Alimentos de la UPCT (Cartagena), donde se procedió a la limpieza, estabilización térmica a 23°C y clasificación de los frutos para las distintas experiencias. Los frutos recolectados destinados al experimento de calidad que no podían ser analizados en el día se almacenaron en una cámara a $10 \pm 1^\circ\text{C}$ (máximo de una semana en 2006 y de un día en 2008 ya que la recolección en este año fue extremadamente escalonada). Los frutos destinados a experiencias de refrigeración se almacenaron en una cámara a $8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ durante 27-28 días, cubiertos con láminas de plástico no herméticas.

6. Atributos de calidad no destructivos.

6.1. Peso

El peso de los frutos (en gramos) se midió con una balanza de precisión de 0,1 g y máximo de 16 kg Sartorius CP16001S (Goettingen, Alemania).

6.2 Diámetro y longitud.

El diámetro máximo de los frutos y su longitud en cm (desde el pedúnculo hasta la parte más distal del centro máximo ecuatorial) se midió con un calibre electrónico digital de 0-600 mm (Tornero, Kalkum Ezquerro S.L, La Rioja, España).

6.3 Escriturado, olor, dehiscencia y apariencia comercial.

La evaluación del escriturado de la piel se basó en una escala visual obtenida tras fotografía digital (Olympus C5050Z, Tokio, Japón) de muestras de frutos que mostraba diferentes grados de escriturado. Los valores de escala según las fotos fueron: 0, nada; 1, muy ligero; 2 ligero; 2,5, ligero a medio; 3, moderado; 3,5 moderado a severo; 4, severo; 5, muy severo.

La presencia ó ausencia de olor en los frutos fue evaluada por la misma persona entrenada, donde cero fue ausencia y uno presencia de aroma.

La clasificación de la apariencia comercial fue realizada por la misma persona entrenada y se basó principalmente en cuatro categorías (extra, primera, segunda y no comercial), en función de factores externos como inmadurez en áreas locales, cicatrices, golpes, etc. La categoría extra incluye frutos sin defectos, la categoría primera y segunda admiten un máximo de área con defectos del 5% ó del 5% al 10% respectivamente, y los frutos no comerciales son aquellos que no tienen el área del pedúnculo entera ó con más de un 10% de área con defectos.

6.4 Densidad

La densidad del fruto ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) se determinó según el método de desplazamiento del agua basado en el principio de Arquímedes. Se empleó una balanza digital de 0,1 g de precisión (Sartorius CP16001S) y dos contenedores cónicos herméticos de un volumen de 10,7 L (Repli S.L., Rubí, Barcelona, España) previamente calibrados con agua destilada. Las tapas tenían dos perforaciones de 1 cm de diámetro. La temperatura del agua (en °C) se midió con un termómetro digital Checktemp1 pocket (Hanna Instruments, Bilbao, España) con sonda de acero inoxidable y $\pm 0,3^\circ\text{C}$ de precisión. La densidad del agua se estimó mediante regresión a partir de datos de Singh y Heldman (1998) según la ecuación: $= -0,0051\cdot T^2 + 0,0057\cdot T + 1000,2$ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), para valores de temperatura entre 10 y 30°C . Posteriormente los frutos se secaron con papel absorbente para eliminar el exceso de agua.

6.5 Color de la piel.

Se realizaron dos medidas de color sobre la piel del fruto con un colorímetro de 8 mm de diámetro (CR-300, Minolta, Ramsey, NJ, EE.UU). El color característico de la piel (normalmente verde) se midió en tres puntos equidistantes del fruto y con ausencia de manchas o cicatrices que pudieran interferir en los resultados. También se midió el color en tres puntos de la cama ó zona en contacto con la tierra durante el desarrollo del fruto (más claro por la menor luz recibida). El colorímetro se calibró previamente sobre superficie blanca tomando como referencia el iluminante C (observador 0° para el colorímetro Minolta CR-300), representativo de luz en días nublados, y fue programado para efectuar tres disparos por medida mostrando el valor promedio. Los resultados se expresaron en las coordenadas del espacio de color C.I.E (Comisión Internacional de Iluminación) L^* , C^* , h^* (luminosidad, croma y ángulo de tono).

Para medir la evolución del color de la piel durante la maduración del fruto, las medidas se efectuaron siempre sobre los mismos puntos previamente seleccionados y señalados con líneas mediante marcador permanente (Sharpie, EE.UU) y situando el colorímetro tangente a las misma.

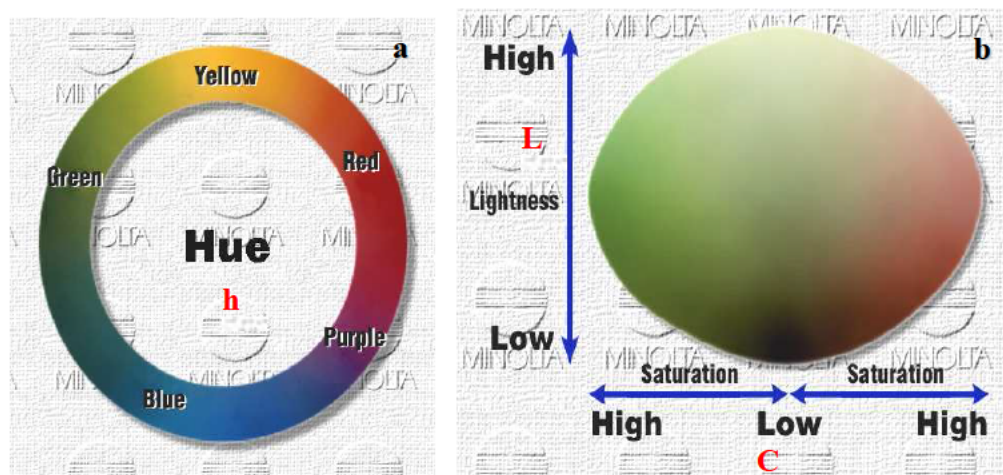


Figura 4. Representación gráfica de las coordenadas C.I.E L*a*b*. a) Valores del ángulo del tono (h). b) luminosidad (L) y croma (C). Internet.

6.6 Textura del fruto entero.

Se midió (en $\text{N}\cdot\text{mm}^{-1}$) la textura (también llamada dureza) lateral y distal del fruto entero de melón. La dureza lateral se determinó en la zona ecuatorial del fruto y la dureza distal se midió con el fruto colocado en vertical con ayuda de un soporte cilíndrico que sirvió de apoyo para la base del fruto. Se empleó un test de compresión del fruto hasta 2,2 mm (en 2006) y 2 mm (en 2008 y 2009), utilizando una célula de carga de 1 kN (2006) y doble recorrido (0-200, 200-2000 kN en 2008 y 2008), y dos platos de compresión de 100 mm Ø o cuadrados, comandados por una máquina de ensayos electromecánica de 5 kN de bastidor (ELIB-5K S.A.E. Ibertest, Daganzo de Arriba, Madrid, España), previamente calibrada. La velocidad de la prueba fue de $15 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ con retorno automático a la posición de ciclos de compresión. Los gráficos de fuerza-distancia se obtuvieron con el software Wintest® Elec-met v. 2.9.70 (Ibertest) y se guardaron en un archivo de Microsoft Power Point 2000 hasta su análisis. La dureza se obtuvo de dividir la fuerza en Newton (N) entre la deformación en mm exactamente medida (Fernández-Trujillo et al. 2005; Tijskens et al. 2009).

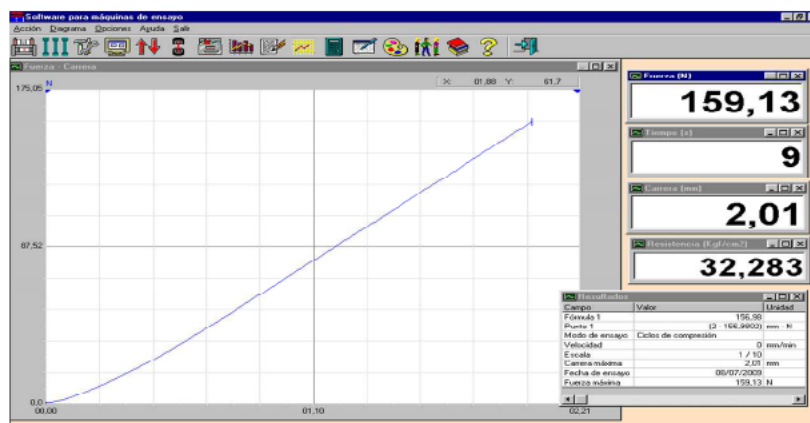


Figura 5. Ejemplo de gráfica fuerza-distancia de la dureza lateral medida en el fruto entero de melón 9M11-6A (control PS). En el eje de ordenadas la fuerza en Newton (N), en el eje de abscisas la deformación en mm.

6.7 Fotografía digital.

Para los experimentos de calidad se tomaron al menos seis fotografías digitales de cada fruto y doce fotografías digitales para los experimentos de seguimiento (punto inicial poscosecha y punto final de seguimiento). Se hicieron cinco fotos de cada fruto entero de melón; tres fotos girando el fruto sobre sí mismo en horizontal e incluyendo una foto de la zona de la cama, y dos fotos del fruto colocado en posición vertical con ayuda de un soporte e incluyendo una fotografía de la zona peduncular y otra de la zona basal. Se tomó también una fotografía de cada fruto cortado longitudinalmente en mitades (una mitad mostrando la piel y otra la pulpa) y siempre colocando las mitades con la misma orientación y posición. En los casos en que se consideró oportuno (desórdenes fisiológicos, inmadurez, daños mecánicos, etc.) se tomaron fotos de detalle.

Previamente a la toma de fotografías, los frutos se secaron con papel absorbente con el objetivo de minimizar los brillos causados por el exceso de agua. Seguidamente, se situaron sobre un fondo de papel negro (2008 y 2009 referencia) ó azul (2006 referencia) montado sobre un atril de 64,5 cm de alto. Se utilizaron soportes cilíndricos (de 2-3 cm de altura y 5-6 cm de diámetro) para evitar el desplazamiento de los frutos. Las fotos se tomaron usando como referencia una escala de 50 cm y para la identificación de cada fruto se emplearon etiquetadoras de precios de mercado con cuatro dígitos, donde se marcaba la campaña, la NIL, la réplica y el fruto. El equipo básico de fotografía consistió en una cámara digital de 5.0 mega pixels (Olympus C5050Z, Tokio, Japón) con accesorio macro y para filtros. Se empleó un filtro azul (Jessop 80A 55-mm) que junto con la velocidad lenta del flash evitaba el amarillo

dominante de los focos. Se usaron dos focos Scanlite (Elinchrom, Profot AG, Suiza) con lámparas halógenas foto-ópticas de 300 y 600 W (Osram, Regensburg, Alemania) con brazos ajustables y paraguas blancos para filtrar la luz. La cámara se montó sobre un trípode situado perpendicularmente a 51,2 cm del fondo. Las especificaciones para la toma de fotografías fueron; posición manual (M), abertura de diafragma f8, opción macro, ausencia de flash, balance automático de blancos, color sRGB, ISO 64 y velocidad desde 1/10 a 1/15. La velocidad dependió del color del fondo (azul o negro), de la distancia de los focos y del tipo de fotografía (pulpa o fruto entero). Las velocidades fueron 1/13 para pulpa y 1/10 para fruto entero en 2006, 1/15 para pulpa y 1/13 para fruto entero en 2008 y 1/10 para pulpa y 1/13 para fruto entero en 2009. La longitud focal fue 11,9 mm (en 2006 y 2008) y 12,1 mm (en 2009). Para los detalles se empleó la opción supermacro ó zoom. En las campañas 2008 y 2009 se incorporó la mejora de un mando a distancia. Las fotografías se almacenaron en formato JPG de alta resolución (2560×1920 pixels) y se utilizó un ordenador personal (Optiplex Gx280, Dell, España) y un software de imágenes (Microsoft Office Picture Manager SP3, Adobe Photoshop CS 8.0.1, Adobe ImageReady CS 8.0.1, EE.UU) para la visualización o retoque.

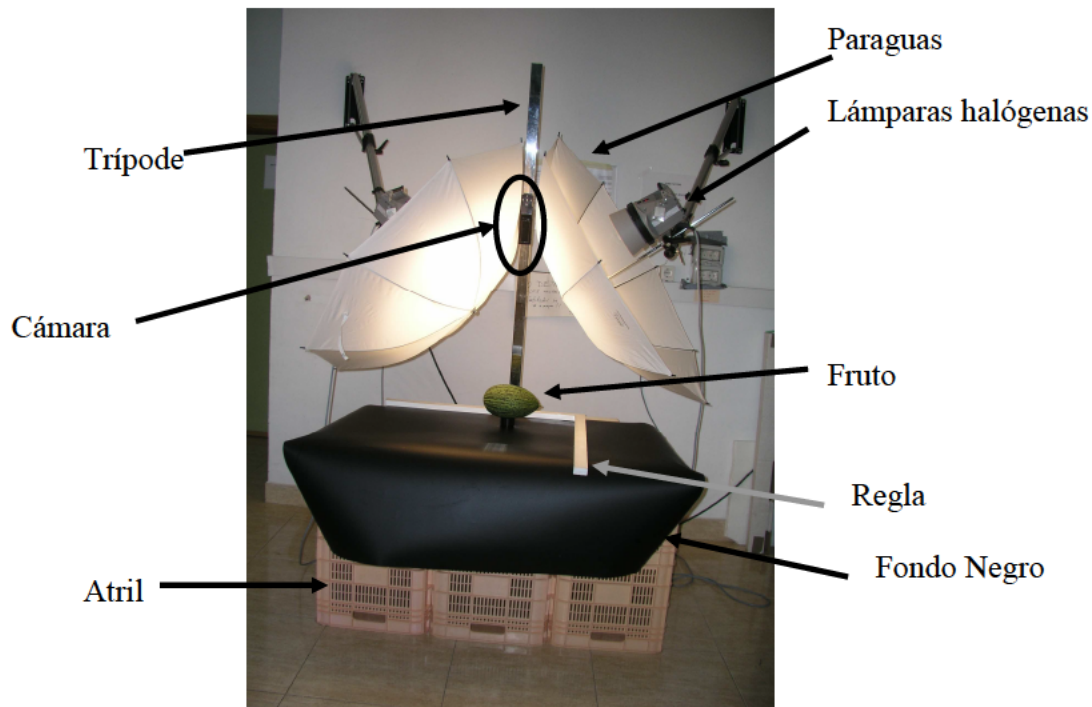


Figura 6. Equipo de toma de fotografías digitales según montaje de Fernández-Trujillo en la planta piloto de tecnología de alimentos de la Universidad Politécnica de Cartagena.

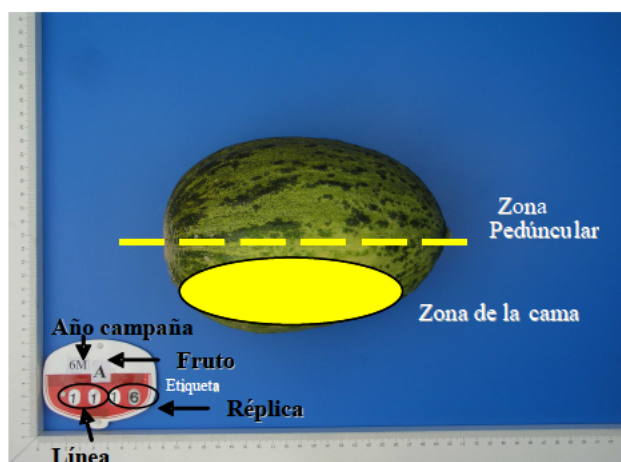


Figura 7. Fotografía de un fruto entero de melón de la línea PS (6M11-16A) y descripción de la nomenclatura de la etiqueta.



Figura 8. Fotografía de las mitades de un fruto de melón de la línea PS (6M11-11A).

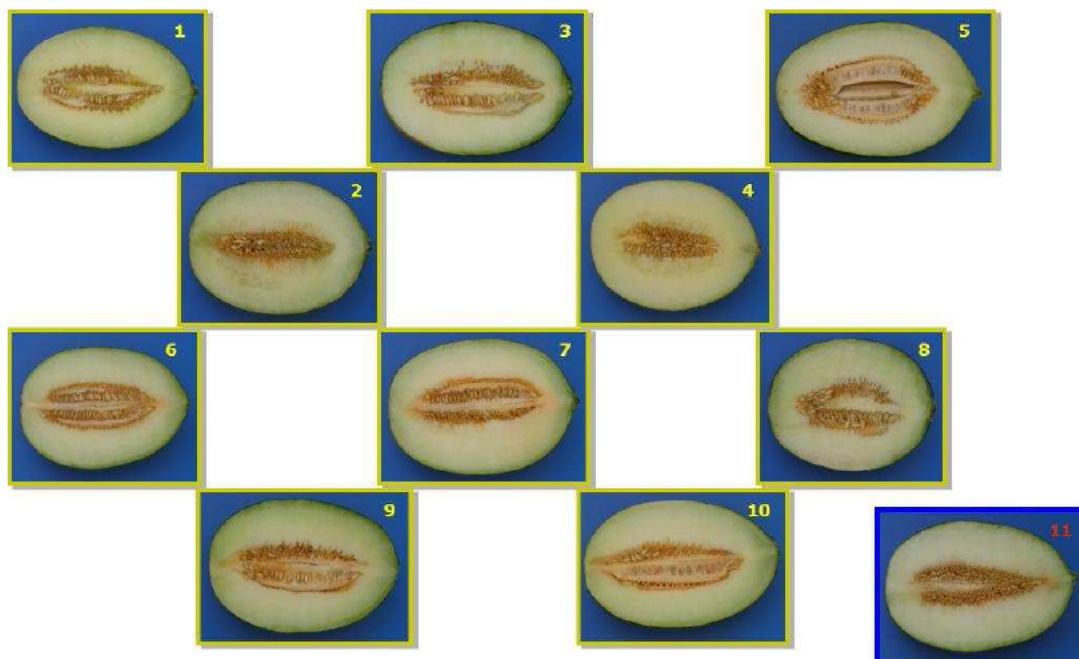


Figura 9. Pulpa de melón de las NILs 6M1 (1), 6M2 (2), 6M3 (3), 6M4 (4), 6M5 (5), 6M6 (6), 6M7 (7), 6M8 (8), 6M9 (9), 6M10 (10) y del parental 6M11 o PS (11).

7. Atributos de calidad destructivos.

7.1 Preparación de muestras.

Las muestras se obtuvieron de frutos recolectados en el mismo día ó almacenados a 10°C no más de 3 días. Tras medición de los atributos de calidad no destructivos, los frutos entraron en la línea de trabajo para la toma de muestras y medición de atributos de calidad destructivos. Cada fruto de melón se cortó longitudinalmente en mitades y se realizó el examen interno y la fotografía de la pulpa (véase en apartado 6.7). Para la toma de muestras se seleccionó la mitad con mejores características y se cortó en varias secciones semiesféricas y perpendiculares a la longitud del fruto.

7.2 Toma de muestras de pulpa.

Se tomó tejido de la zona ecuatorial de la pulpa (evitando la zona seminal y cercana a la corteza) en forma de cilindros de 20 mm de alto x 15 mm de diámetro con descorazonadores de manzana de acero inoxidable de 15 mm Ø (Valira, Reus, Tarragona, España ó Alexalo 8005, Aleissi SCCL, Canovelles, Barcelona, España). Se pesaron entre 35-50 g con una balanza digital de precisión de 0,01 g (ST3100 Gram Precision, Mississauga, Ontario, Canada). Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron en bolsas con cierre de alambre de 180 mL (Nasco whirl-pak, Nasco, Fort Atkinson, WI, EE.UU). Las muestras se conservaron a -80°C en ultracongeladores (Thermoforma y ThermoScientific 86C, Thermo Electron Co., EE.UU) (Dos-Santos et al. 2007).

7.3 Toma de muestras de zumo.

El zumo de melón se obtuvo de los cilindros de pulpa con extractores de zumo manuales idénticos (Simplex Super, Italia). Posteriormente el zumo se filtró mediante una gasa de cuatro capas colocada sobre un embudo. El zumo filtrado se guardó en viales de 15 mL (Deltalab S.L.U., Rubí, Barcelona, España) y 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) en un congelador de -25°C (Liebherr Premium no frost A++ GNP 3376, Alemania) hasta posterior análisis de densidad, jugosidad, acidez titulable, ácidos orgánicos y azúcares (Fernández-Trujillo et al. 2005).

Los aromas volátiles se midieron a partir de una solución preparada a partir del zumo filtrado y una disolución saturada de cloruro cálcico dihidratado empleada para retener los volátiles. Para la disolución se pesaron 197,35 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac Química S.A., Castellar del Vallés, Barcelona, España) que se añadieron poco a poco a

un vaso de precipitado con aproximadamente 150 mL de agua mQ (conductividad 18 $\Omega\cdot\text{cm}$; sistema 56 MilliQ, Millipore, Milford, MA, EE.UU) a 20°C y agitación constante. Finalmente se añadió el volumen restante de agua mQ hasta completar los 200 mL previamente medidos en un matraz. La disolución se conservó a 4°C hasta su uso.

Para preparar 25,2 mL de solución de zumo con cloruro cálcico, se prepararon unos 30 mL de zumo según metodología descrita. Se tomaron 18 mL con pipeta de 25 mL de un solo uso adaptada a un controlador (Biohit Midi Plus, Biohit PLC, Helsinki, Finlandia) y se midieron 3 min con cronometro digital con alarma desde la preparación del zumo. Transcurrido este tiempo se agregaron 7,2 mL de la disolución de cloruro cálcico previamente atemperada a 20°C. La solución se homogenizó y se transfirió a viales de 15 y 5 mL (Deltalab) previamente etiquetados e identificados con rotulador permanente (Sharpie). Finalmente las muestras se almacenaron a -80°C en ultracongeladores (Thermoforma y Thermoscientific 86C) hasta posterior análisis.

7.4 Toma de muestras de corteza.

En las campañas 2006 y 2008 se tomaron algunas muestras de corteza de melón para diferentes análisis. Se emplearon peladores de cáscara de manzana de acero inoxidable sobre zonas sin defectos y evitando la zona de la cama. Se pesaron entre 15-20 g de corteza de melón con balanza digital de 0,01 g de precisión (ST3100 Gram Precision) y se congelaron rápidamente mediante inmersión en nitrógeno líquido. Se guardaron en bolsas con cierre de alambre de 100 mL (Nasco whril-pak) previamente etiquetadas y se almacenaron a -80°C en ultracongeladores (Thermoforma y Thermoscientific 86C) hasta posterior análisis.

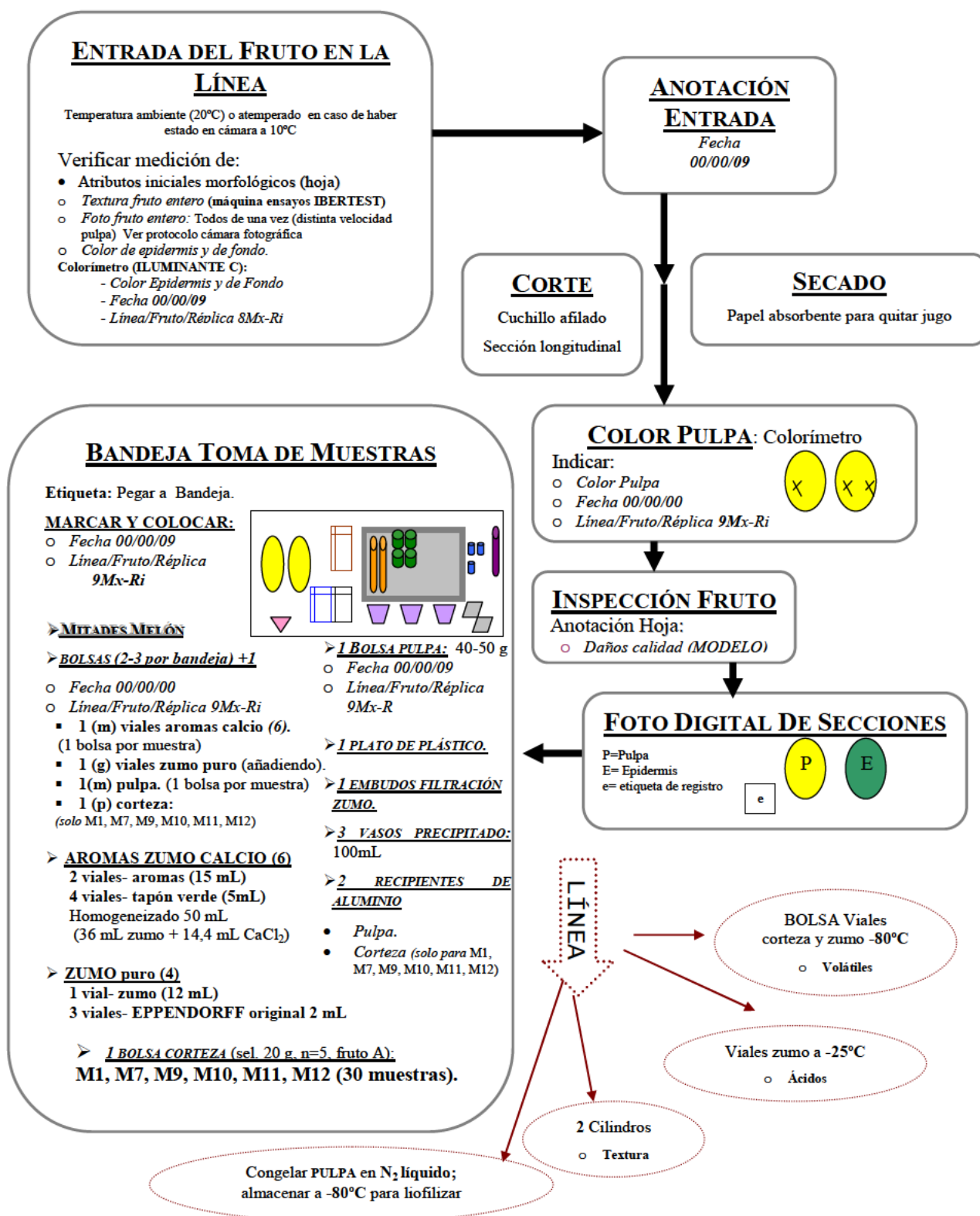


Figura 10. Ejemplo de diagrama de flujo seguido en la planta piloto de Tecnología de Alimentos de la UPCT para el análisis de calidad y toma de muestras de NILs de melón y sus parentales en la campaña 2009 (Dos-Santos, elaboración propia).

7.5 Parámetros morfológicos.

El espesor de la corteza y de la pulpa en mm se midió en la zona ecuatorial de los frutos con un calibre electrónico digital de 0-150 mm (Sesa Tools, S.A, Guipuzcoa, España). Ambas variables permiten una estimación de la porción comestible de los frutos de melón sin semillas.

7.6 Color de la pulpa y del zumo.

Se midió el color de la pulpa con un colorímetro (Minolta CR-300), según metodología anteriormente descrita. Para medir el color del zumo recién exprimido se empleó el accesorio CR-A70 (Osaka, Japón) y un tubo limpio de vidrio transparente para colocar en dicho accesorio con un volumen de zumo mínimo para superar la apertura de medición del mismo.

7.7 Firmeza de la Pulpa.

La firmeza de la pulpa (en N) se midió en cilindros de 20 mm de alto x 15 mm de diámetro obtenidos con descorazonadores de manzana de acero inoxidable (según metodología descrita en el apartado 6.6). Se eliminó cualquier inclinación de los cilindros con ayuda de bisturís (similares a los de medicina) y se realizó un ensayo de punción con una sonda de 1,6 mm TG83 (Ibertest) adaptada al equipo de textura (ELIB-5K) con una célula de carga de 200 N. La precarga inicial fue de 1 N y el test de punción del fruto llegó hasta punto de ruptura, fijándose un máximo en la carrera del equipo suficiente para obtener el máximo (Fig. 11) pero evitando el llegar a niveles de riesgo de deterioro del equipo por contacto del punzón con la placa inferior, aunque el cilindro tenía 10 mm de largo. Este valor se fijaba en 4 mm lo que además reducía el tiempo de análisis.

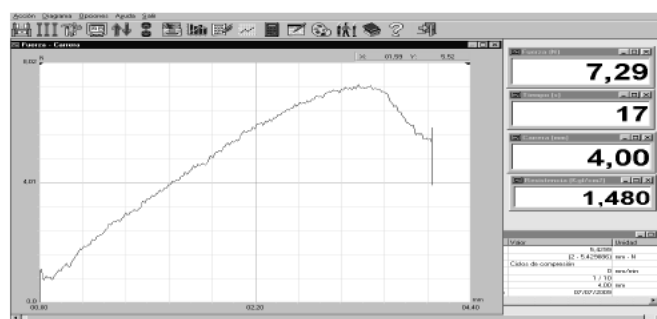


Figura 11. Representación gráfica de la firmeza de la pulpa en N de un fruto de una NIL de melón de la campaña 2008. En el eje de ordenadas la fuerza en N, en el eje de abscisas la deformación en mm.



Figura 12. a) Equipo de medición de textura ELIB-5K. b) Detalle de la sonda TG83 para medir la firmeza de la pulpa con punzón de 4,6 mm de diámetro montado sobre una célula de carga calibrada de doble recorrido de 2 kN (0-200, 200-2000 N).

7.8 Jugosidad de la pulpa.

La jugosidad se obtuvo pesando una cantidad exacta de cilindros de pulpa (aprox. 60 g en 2006 y 200 g en 2008 y 2009) y el volumen de zumo obtenido con una balanza de precisión (ST3100 Gram Precision). El zumo se obtuvo exprimiendo la pulpa con una prensa manual de aluminio (Super Simplex) y filtrando con una gasa de cuatro capas (75×75 mm) colocada sobre un embudo. El volumen final se pesó en un vaso de precipitado de plástico previamente tarado. Los resultados se expresaron como porcentaje resultante de dividir el peso del zumo por el peso total de la pulpa. El zumo se guardó en viales de 12 mL (Deltalab) y de 1,5 mL (Eppendorf AG) a -25°C (Liebherr Premium no frost A++ GNP 3376) para posteriores análisis (densidad, jugosidad del zumo, acidez titulable, azúcares, ácidos orgánicos, etc).

7.9 Densidad del zumo.

La densidad del zumo se determinó pesando con balanza de precisión digital de 0,00001 g (BP 211D Sartorius, Goettingen, Alemania) un 1 mL de zumo previamente descongelado y atemperado en baño de agua hasta a 20°C medidos con termómetro digital (Checktemp1 pocket Hanna Instruments).

7.10 Jugosidad del zumo.

La jugosidad se midió en 1,5 mL de zumo de melón almacenado a -25°C en viales Eppendorff previamente descongelados y atemperados a 20°C. Se centrifugaron (microcentrífuga 5415D Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 20 min a 14000 rpm y se eliminó la fracción sobrenadante con ayuda de pipeta Pasteur. El peso (en gramos) de los viales etiquetados (P1), los viales con zumo atemperado (P2) y los viales centrifugados sin sobrenadante (P3) fue medido en una balanza de precisión (ST3100 Gram Precision). La jugosidad se expresó como porcentaje de jugo según la siguiente ecuación: $\text{Jugosidad} = ((P2 - P3)/(P2 - P1)) \cdot 1000 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$

7.11 Materia seca.

El proceso de liofilización sobre muestras de pulpa de melón conservadas a -80°C. se llevo a cabo siguiendo metodología ampliamente descrita en Dos-Santos et al. (2007). La pulpa se trituró dentro de las bolsas de almacenamiento (Nasco) con un martillo de cabeza plástica Palmera (Herramientas Eurotools S.A., Vitoria, España). El producto en polvo se vació sobre recipientes alimenticios de aluminio (Albal, Bilbao, España; ITS, Apeldoorn, Holanda) de varias dimensiones (75 mm de diámetro superior x 60 mm de diámetro inferior x 40 mm de altura; 74,3 x 50,4 x 51,05 y 60 x 45 x 45 mm). La liofilización se llevó a cabo en tandas de 50-60 muestras en la cámara de refrigeración RC300 del liofilizador Supermodulyo (Thermo Savant, Thermo Electron Corporation, Holbrook, NY, EE.UU) dotada con una bomba de vacío VLP285 (Thermo Savant) (alrededor de 2,4 kg de producto máximo por tanda, unos 2-2,2 kg de agua que tras pasar a hielo es necesario sublimar máximo por tanda, más unos 0,1-0,2 kg por escarchado del equipo al colocar las muestras).

El proceso comenzó con la colocación de las muestras y tres termopares de tipo E (cromo/constantano) en los cuales se colocó un cilindro de melón del tipo ‘Piel de Sapo’ (previamente obtenido de melones comerciales) como referencia de las temperaturas del refrigerador. La luz de la habitación permaneció apagada y la cámara se cubrió con

terciopelo negro fijado al lateral con Velcro® adhesivo para evitar la degradación de compuestos sensibles a la luz. Una vez estabilizada la temperatura del producto congelado en el equipo, se conectó la bomba de vacío. La temperatura del condensador fue de -60°C durante el proceso y tenía una capacidad de condensación de hielo según el fabricante fue de 0,5 kg·h⁻¹. El proceso de liofilización comenzó cuando las muestras en la cámara de refrigeración adquirieron una temperatura de -35°C, temperatura a la cual se conectó la bomba de vacío para tener una presión de condensación que osciló entre 0,1 a 0,12 mbar y nunca sobre 0,1333 mbar (0,1 torr.). El proceso continuó conforme se incrementaba gradualmente la temperatura de las bandejas de liofilización, siempre tratando de tener un gradiente de temperatura entre estas y las muestras de 5°C de acuerdo con las instrucciones de Virtis (2008). El fluido de intercambio de calor de las bandejas fue aceite de silicona Baysilone M5 (Swantek, Kendal, Cumbria, Inglaterra) que permite variaciones de temperatura de $\pm 1^\circ\text{C}$ dentro de la cámara (Thermo) para facilitar la salida del vapor de las muestras hacia el condensador. El proceso completo por tanda tardó cerca de 7 días con una temperatura final de 20°C, con cambio de temperatura en un tiempo máximo tal que la muestra alcanza la temperatura de las bandejas (hasta 3 días a veces).

Los recipientes con muestra fueron retirados inmediatamente del equipo para evitar su rehidratación. El material liofilizado se pesó en balanza de precisión (ST3100 Gram Precision) en bolsas con cierre zip (60 x 10, China) previamente taradas y etiquetadas y se almacenaron a -25°C en contenedores herméticos (Rubbermaid Iberia S.A., Zaragoza, España y Aramis, Cerdanyola del Vallés, Barcelona, España). La materia seca se calculó como sigue: $100 - [(\text{Peso Inicial} - \text{Peso final}) / (\text{Peso Inicial} \times 100)]$.

7.12 Parámetros químicos.

7.12.1 pH

El pH del zumo se midió con un pHmetro portátil (Checker Hanna Instruments Ltd, Leighton, UK) previamente calibrado con tampones de pH 4.0 y 7.0 (Crison Instruments S.A, Alella, Barcelona, España) a 20°C.

7.12.2 Sólidos solubles totales.

El contenido en sólidos solubles totales (SST) (en °Brix) se midió (previa calibración con agua destilada) con un refractómetro manual a 20°C (Atago N-1E, Tokio, Japón) en la campaña 2006 y un refractómetro digital de mano (Pocket, Atago PAL-1, Tokio, Japón) en las campañas 2008 y 2009.

7.12.3 Acidez titulable.

La acidez titulable (AT) se determinó en 5 mL de zumo diluido con agua destilada hasta un volumen final de 40 mL. El zumo se descongeló y atemperó previamente hasta 20°C en un baño de agua a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadió NaOH factorada 0,1 N hasta pH 8,1 con un valorador automático (Metrohm SwissMade 716DMS, Herisau, Suiza). Los resultados de AT se expresaron en mmol H⁺·L⁻¹ (Fernández-Trujillo et al. 2005) y en porcentaje del ácido predominante, en este caso ácido cítrico (para calcular la relación de dividir SST entre AT ó índice de madurez).

7.12.4 Azúcares.

Previamente al análisis de azúcares (y ácidos orgánicos), las muestras de zumo de melón almacenado a -25°C (Liebherr Premium no frost A++ GNP 3376) fueron atemperadas a 20°C en baño de agua y centrifugadas a 12000 rpm durante 15 min a 4°C en una centrífuga (modelo 5415D, Eppendorf) para eliminar la parte fibrosa. El sobrenadante fue filtrado con filtros físicos OasisTMHLB (500 mg, 6 mL, Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU) previa activación de los mismos y filtros químicos no estériles de 0,45 µm de tamaño de poro y 13 mm Ø (Millex-HV PVDF Durapore Millipore, Billerica, MA, EE.UU).

El contenido en azúcares de las muestras de la campaña 2006 fue determinado por cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE). La concentración de azúcar soluble fue determinada en una alícuota de 15 µL de muestra empleando una columna de alto rendimiento (4,6 x 250 mm) (Waters, EE.UU) con un detector IR Mod 2414 (Waters, EE.UU), a una longitud de onda de 512 nm. El tiempo de corrida fue de 10 min con una velocidad de flujo de 2 mL·min⁻¹. Se empleó como fase móvil una solución de Acetonitrilo (C₂H₃N) y agua mQ (conductividad 18 Ω·cm) en una combinación 80:20 v/v-isocrático. Los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa se identificaron en comparación con los tiempos de retención usando patrones externos (Sigma) desde 25 a 100000 ppm. Se verificó la ausencia de otros azúcares como maltosa y lactosa. El peso

molecular de cada compuesto se empleó para transformar los resultados originales de la composición $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de zumo fresco exprimido a $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso de fruto fresco (Obando-Ulloa et al. 2009a). El dulzor fue calculado como equivalentes de sacarosa (Saceq) según la fórmula $\text{Saceq}=1\times[\text{Sacarosa}]+0,74\times[\text{Glucosa}]+1,73\times[\text{Fructosa}]$ (Baldwin et al. 1998).

La composición de azúcares en zumo de melón de las muestras de las campañas 2008 y 2009 fue determinada por un sistema de cromatografía iónica (CI). Las muestras se filtraron previamente según metodología descrita. Se inyectaron 10 μL de muestra diluida 1:200 a 1:400 v/v de muestra en combinación con la fase móvil utilizada (NaOH 80 mM, preparada con agua desionizada ó agua DI H_2O , tipo I, conductividad 18 $\Omega\cdot\text{cm}$ y previamente desgasificada). El equipo constó de un módulo cromatográfico con detector PAD, válvula de inyección y termostatación Metrohm (871 Advanced Bioscan, Metrohm AG, Herisau, Suiza), célula de detección Varicell (Metrohm) con electrodo de trabajo en oro, bomba isocrática de alta presión para el canal PAD (818 IC, Metrohm) y automuestreador automático (863 Compact Autosampler, Metrohm). El flujo de trabajo fue de 0,9 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a $32 \pm 0,1^\circ\text{C}$ y una presión de 10 Mpa. Se emplearon columnas Metrohm específicas para la determinación de carbohidratos Metrosep Carb 1-150 (150 x 4 mm) y Metrosep Carb 1-250 (250 x 4,6 mm), con guardacolumna Metrosep Carb1 Guard. El uso de dos columnas optimiza una mejor separación de la glucosa y la galactosa si esta aparece. Se usaron patrones externos de glucosa, fructosa, xilosa y sacarosa (Sigma) desde 100 a 1000 ppm para la cuantificación de los azúcares. Bajo condiciones estándar, el límite de detección para estos azúcares fue de 0,02-0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (ppm). Se verificó la ausencia de otros azúcares como ramnosa, arabinosa y galactosa. El peso molecular de cada compuesto se empleó para transformar los resultados originales según Obando-Ulloa et al. (2009). El dulzor fue calculado como equivalentes de sacarosa (Saceq) según la fórmula de Baldwin et al. (1998).



Figura 13. Sistema Metrohm de cromatografía iónica con cuatro canales de separación. Equipo localizado en el Servicio de Apoyo de Investigación Tecnológica (SAIT) de la UPCT.

7.12.5 Ácidos orgánicos.

La composición de ácidos orgánicos de las muestras de la campaña 2006 fue determinada en pulpa liofilizada de melón previa extracción de los mismos.

El proceso de extracción ha sido ampliamente descrito en Dos-Santos et al. (2007). Se tomó 1 g de tejido y se pesó en tubos de centrifuga de 15 mL de polietileno (Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA, EE.UU) con una balanza de precisión digital (BP211D Sartorius). Se añadieron 10 mL de fase móvil refrigerada a 4°C mediante pipeta dosificadora automática digital de 2,5 a 25 mL (Brand GMBH+CO KG, Wertheim, Alemania). La fase móvil fue una solución de KH_2PO_4 50 mM (Panreac, Montcada, Barcelona, España), a pH 3,0 con ácido sulfúrico (pureza 96%, Panreac), en combinación de agua mQ y metanol (99:1 v/v) de calidad para CLAE (Labscan Ltd, Dublin, Irlanda). La fase móvil fue previamente filtrada con membrana amicon de 35 μm y desgasificada durante 15 min con un sistema de ultrasonidos (Ultrasons, Selecta, Barcelona, España). La gradilla de muestras se introdujo en un recipiente de poliuretano hermético (Komax, Biokips, Corea), con hielo para su homogeneización y se colocó en un agitador (Orbital SSL1 Stuart, Barloworld Scientific Limited, Staffordshire, UK) a 800 rpm (1710 gn) durante 30 min. Se trabajó en una cámara a 8°C con la luz apagada. A continuación los tubos se centrifugaron a 18000 rpm (38465 gn) durante 15 min a 4°C en centrífuga (Avanti J25, Beckman) con rotor de 24 tubos de capacidad (tipo JA25.1, Beckman) previamente equilibrados. En caso de observar una capa fibrosa en la

superficie del sobrenadante se retiró manualmente con la punta de una pipeta Pasteur. Posteriormente se tomó 1 mL de muestra y se filtró según metodología descrita con filtros físicos (Oasis HLB Waters Corporation) y filtros químicos (Millex, Millipore). Los viales Eppendorf se almacenaron a -25°C en un congelador (Liebherr Premium no frost A++ GNP 3376) hasta posterior análisis por CLAE. Posteriormente se prepararon viales de tapón roscado con agujero CC-8-SC (Chromacol LTD, Trumbull, CT, EE.UU) con 1 mL de muestra y se procedió a su análisis.

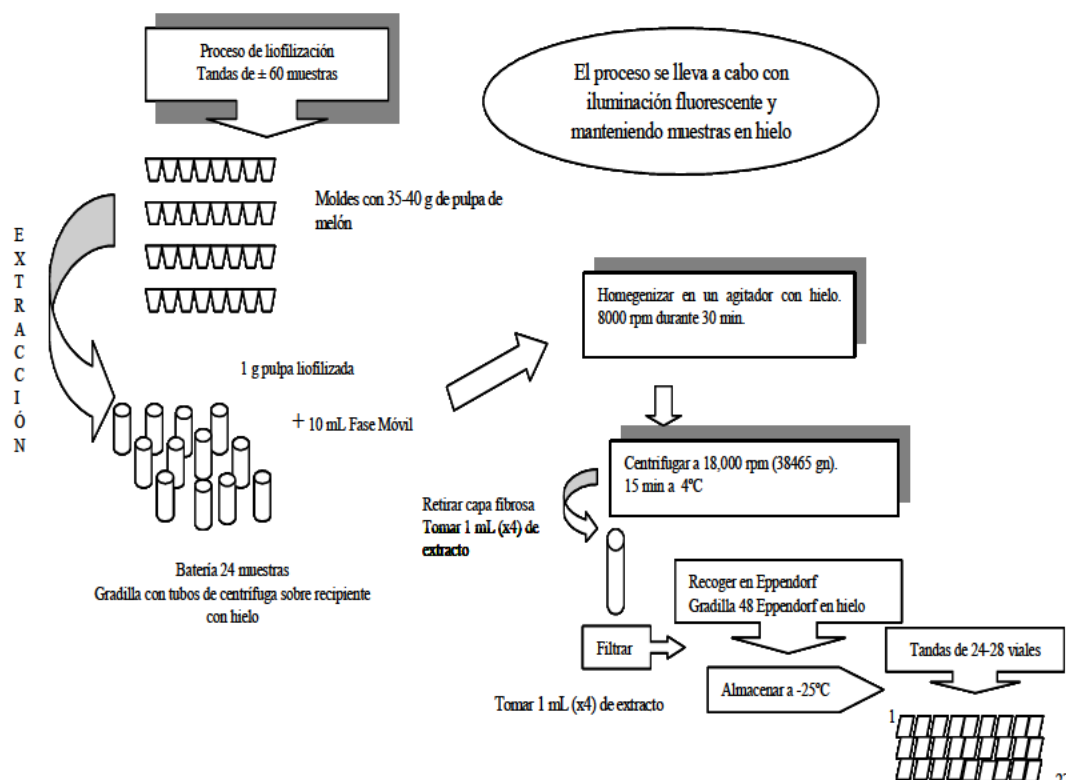


Figura 14. Proceso de extracción de ácidos orgánicos en muestras de pulpa liofilizada de melón para posterior análisis por cromatografía iónica de alta eficiencia (Dos-Santos et al. 2007).

Se inyectó una alícuota de 10 μL de muestra en un sistema CLAE de cuatro canales (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). Se empleó una columna de 4 x 250 mm con un tamaño de partícula de 5 μm (Lichrospher, 60RP SelectB Merck KGaA, Darmstadt, Alemania). La presión de trabajo fue $45 \text{ kg} \cdot \text{cm}^{-2}$ y la temperatura de la columna de 30°C con un flujo de $0,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El tiempo de corrida fue de 50 min a una longitud de onda de 210 nm. Los ácidos orgánicos succínico, fumárico, glutámico, cítrico, isocítrico, ascórbico, láctico, pantoténico, oxalacético, oxálico, aspártico, quínico y DL-málico se identificaron por comparación de los tiempos de retención con los patrones desde 0,04 a

145,82 mmol·L⁻¹ (8,20 a 19,93 ppm) (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania y Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, Mo, EE.UU) (Dos Santos et al. 2007).

La composición de ácidos orgánicos de las campañas 2008 y 2009 fue determinada en zumo de melón mediante dos métodos (I y II) en un equipo CLAE. Se emplearon dos métodos para evitar los problemas derivados de la coelución de picos ó límites de detección del equipo.

Método I: Se inyectó una alícuota de 10 µL de una disolución 1:10 v/v (a veces 1:20) de muestra en combinación con agua desionizada ó agua DI H₂O. Se trabajó con una columna REZEX ROA Organic Acid (300 x 7,8 mm, Phenomenex Inc, CA, EE.UU) con precolumna a T^a ambiente (AJO-4490-S, Phenomenex Inc). La fase móvil utilizada fue H₂SO₄ 0,005 N a un flujo de trabajo de 0,5 mL·min⁻¹. La temperatura de las muestras fue de 5°C y se leyeron una longitud de onda de 210 nm. Se empleó un detector de matriz de fotodiodos de 190 a 400 nm (modelo 2996, Waters) conectado a un CLAE (Alliance 2695, Waters). Los ácidos orgánicos oxálico, cítrico, tartárico, ascórbico, succínico y fumárico, se identificaron por comparación con los tiempos de retención usando patrones externos desde 50 a 500 mg·L⁻¹ (ppm) (Sigma-Aldrich Chemical Co., Madrid, España). Bajo condiciones estándar, el límite de detección para estos ácidos fue de 0,046-789,39 mg·L⁻¹ (ppm) (factor de dilución x10 ó x20). El peso molecular de cada compuesto se empleó para transformar los resultados originales de la composición µg·mL⁻¹ de zumo fresco exprimido a µmol·g⁻¹ de peso de fruto fresco (Obando-Ulloa et al. 2009a).

Método II: Se inyectó una alícuota de 10 µL de una disolución 1:10 de muestra en combinación con agua desionizada. Se trabajó con una columna LUNA C18 (5 µm, 250 x 4,6 mm, Phenomenex Inc) con precolumna a T^a ambiente (AJO-4287-S, Phenomenex Inc). La fase móvil empleada fue agua desionizada en combinación de metanol y ácido trifluoroacético 97,7:2.2:0,1 v/v/v con un flujo de 0,7 mL·min⁻¹. Las muestras a 5°C se leyeron a 210 nm usando un detector de matriz de fotodiodos de 190 a 400 nm (modelo 2996, Waters) conectado a un CLAE (Alliance 2695, Waters). Los ácidos orgánicos málico, láctico y pantoténico se identificaron por comparación con los tiempos de retención usando patrones externos desde 50 a 1.000 mg·L⁻¹ (ppm) (Sigma-Aldrich Chemical Co). Bajo condiciones estándar, el límite de detección para estos ácidos fue de 0,700-2187,040 mg·L⁻¹ (ppm) (factor de dilución x10).



Figura 15. Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (Waters Alliance 2695). Equipo localizado en el Servicio de Apoyo a la Investigación Tecnológica (SAIT-UPCT).

7.12.6. Compuestos volátiles.

7.12.6.1 Determinación de compuestos volátiles en zumo.

Las muestras se tomaron de los viales almacenados a -80°C de 12 y 5 mL (Deltalab) de zumo con cloruro cálcico saturado preparados según la metodología descrita anteriormente (véase apartado 7.3).

La metodología para la determinación de compuestos volátiles en zumo ha sido ampliamente detallada en Dos-Santos et al. 2013 (véase apartado 2.4, capítulo 5). La composición en aromas volátiles del zumo de melón fue determinada por cromatografía de gases-masas (CG-MS) (Muriel et al. 2004; Obando-Ulloa et al. 2008). Se empleó un cromatógrafo gases HP 6890N GC series II (Hewlett-Packard, Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, EE.UU) acoplado a un detector de masas HP 5975 MSD con un cuadrupolo hiperbólico monobloque recubierto de oro y detector multiplicador de electrones dínodo de alta energía (HED) (Hewlett-Packard). Para las muestras de las campañas 2008 y 2009 se aplicó además un sistema de bloqueo del tiempo de retención (RTL) fijando una presión constante de trabajo en el equipo de cromatografía y calibrando el tiempo de retención del patrón interno a 18,5 min. Con esto se consiguió que los tiempos de retención de los compuestos que eluyeron para una misma columna y metodología de análisis de CG-MS fueran los mismos.

Los viales con muestras de zumo de melón se atemperaron en un baño de agua a 35°C durante 15 min y tenían un volumen total de 10 mL a diferencia de otros métodos (Obando-Ulloa et al. 2008) donde se habían usado viales del doble de volumen. Una

alícuota de 2,32 mL de muestra se introdujo en viales de cristal de 10 mL para SPME (Cooler VT-32, Gerstel, Alemania). Como patrón interno se añadieron 10 μ L fenil etil alcohol 0,01% v/v (preparado con agua desionizada ó tipo I) previamente atemperado, (muestras de 2006) y 20 μ L de fenil etil alcohol al 0,05% v/v (muestras de 2008 y 2009). Los viales se agitaron manualmente y se taparon con tapones magnéticos metálicos de encapsulado (Gerstel) con septums de silicona (Alltech Associates, Inc., Deerfield, IL, EE.UU). Se cerraron herméticamente con encapsulador. Una tanda de muestras se colocó en el portamuestras para su análisis y el resto se conservaron en refrigeración a 4°C y se añadieron paulatinamente para su análisis puesto que tenían una vida útil limitada a temperatura ambiente de 12 h. Previamente al análisis, la fibra SPME de 1 cm de largo con 50-30 μ m de divinilbenceno/carboxeno sobre revestimiento de polidimetilsiloxano (57329-U, DVB/CarboxenTM/PDMS Stable FlexTM Fiber, Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU) fue acondicionada a 250°C durante una 1 h mediante introducción en el inyector a la profundidad suficiente. Los compuestos volátiles fueron separados con una columna capilar HP-5MS (Agilent 19091S-433) de 30 m x 250 μ m y un tamaño de partícula de 0,25 μ m, conteniendo fenil metil siloxano al 5% como fase estacionaria. El tiempo de incubación de las muestras fue de 2 h a una temperatura de 35°C para la formación del espacio de cabeza. La aguja penetraba 22 mm (muestras 2006) y 21 mm (muestras 2008 y 2009) en el espacio de cabeza del vial y se mantenía 30 min a 35°C absorbiendo los volátiles. Tras la extracción, tuvo lugar la desorción de los compuestos de la fibra en el inyector del cromatógrafo de gases 6890N. El tiempo de desorción fue de 3 min.

Para las muestras 2006 se fijaron los siguientes parámetros: El inyector operó en modo splitless con una temperatura inicial de 280°C. La presión fue de 79,427 KPa (11,53 psi), y un flujo total de 54,4 mL·min⁻¹. El gas portador fue helio con un flujo de 1,5 mL·min⁻¹. La temperatura del horno fue de 35°C, seguida de una rampa de 2°C·min⁻¹ hasta 75°C, y luego a 50°C·min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura final de 250°C que se mantuvo durante 5 min. Se empleó una camisa (liner) de entrada de cristal (SPME/direct, Supelco) de 78,5 mm × 6,5 mm × 0,75 mm de diámetro interno. La temperatura del detector fue de 230°C. El tiempo de análisis captando datos para el cromatograma fue de 27,5 min, con un tiempo total de 50-55 min por muestra. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización electrónica a 70 eV y un rango de espectros de 40-450 *m/z*.

Para las muestras 2008 y 2009 los parámetros fueron los que siguen: El inyector operó en modo *splitless* con una temperatura inicial de 260°C. Se trabajó a presión constante de 92,53 kPa (13,43 psi) y un flujo total de 44,5 mL·min⁻¹. El gas portador fue helio con un flujo de 1,7 mL·min⁻¹. La temperatura del horno fue de 35°C, seguida de una rampa de 2°C·min⁻¹ hasta 75°C, y luego a 50°C·min⁻¹ hasta alcanzar una temperatura final de 200°C que se mantuvo durante 5 min. El tiempo de equilibrio fue de 0,5 min con un tiempo de enfriado de 0,10 min. Se empleó una camisa de entrada de cristal (SPME/direct. Supelco) de 78,5 mm × 6,5 mm × 0,75 mm de diámetro interno. La temperatura del detector fue de 260°C. El tiempo de análisis captando datos para el cromatograma fue de 27,5 min, con un tiempo total de 37,5 min por muestra. Los espectros de masas se obtuvieron mediante ionización electrónica a 94 eV y un rango de espectros de 40-450 *m/z* durante 30 min.

La metodología para la identificación de los compuestos volátiles en zumo ha sido ampliamente detallada en Dos-Santos et al. 2013 (véase apartado 2.4, capítulo 5). Los cromatogramas y los espectros de masas fueron evaluados usando el software ChemStation (G1701DA D.02.00.275, Agilent Technologies Inc. EE.UU). Los compuestos volátiles se identificaron tentativamente por comparación de sus espectros de masas obtenidos con el espectrómetro de masas (5973 Network Mass Selective Detector, Agilent Technol.) acoplado al cromatógrafo de gases, con aquellos incluidos en banco de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L, versión de búsqueda 2.0 y por comparación con los tiempos de retención linear (LRI) ó índices de Kovats recogidos en la literatura (véase tabla 3 y tabla suplementaria 1, capítulo 5) o en la base de datos NIST (<http://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser.html>)

Se obtuvieron los números CAS (Chemical Abstracts Service) de los volátiles de de la base de datos NIST05a.L de la *Chemstation* y de diversas fuentes de información (véase tabla 3 y tabla suplementaria 1, capítulo 5). Los compuestos fueron nombrados según nomenclatura de la *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC).

Los volátiles fueron clasificados en diez clases de compuestos (ácidos, alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, compuestos derivados del azufre, ésteres acetato, ésteres no acetato, otros, terpenos) y todas las áreas de los compuestos se añadieron a la clase correspondiente y los porcentajes se basaron en el área total de los compuestos identificados.

Para los compuestos volátiles individuales, el área de cada compuesto se normalizó de acuerdo con el estándar interno y los resultados se expresaron como porcentaje del

área normalizada de cada compuesto dividido por recuento de área total de los compuestos identificados.

Se descartaron las variables que representaron compuestos volátiles con una presencia por debajo del 25% de los frutos y del 50% de las réplicas analizadas en todas las líneas de melón. Los compuestos volátiles tales como derivados de silanos y siloxanos, o compuestos orgánicos volátiles asociados con la contaminación, la composición del plástico de los viales, y la fibra del equipo se descartaron.

Se incluyeron las notas aromáticas descriptivas de los compuestos volátiles y que fueron obtenidas de diversas bases de datos (*Pherobase*, *The Good Scent Company Database* y *Flavornet and Human Odor Space*, principalmente) y de una exhaustiva revisión bibliográfica. Del mismo modo, los principales precursores implicados en la síntesis de los compuestos volátiles aromáticos identificados y sus metabolismos han sido descritos procedente de numerosas fuentes bibliográficas (véase tabla 3 y tabla suplementaria 1, capítulo 5).



Figura 16. a) Cromatógrafo de gases 6890N de Agilent. b) Detalle del portamuestras. Equipo localizado en el SAIT-UPCT.

7.12.6.2 Determinación de compuestos volátiles en fruto entero.

En las campañas 2008 y 2009 se llevaron a cabo sendos experimentos para medir la evolución de la composición aromática con el tiempo en frutos enteros de melón. Se emplearon tres genotipos de melón (parentales y una NIL climática) con tres repeticiones por genotipo de fruta y una sola réplica.

La metodología ha sido descrita en Fernández-Trujillo et al. 2010. Las muestras se tomaron el día de la cosecha (día 0) y tras varios días a 20°C y 95% HR. El fruto entero de melón se colocó en contenedores herméticos de 5283 cm³ de volumen libre exacto

(nominal 5 L), 180 mm de diámetro y 245 cm de alto (Sunbox Distribución SL, Granollers, Barcelona). Se emplearon barras Gerstel PDMS de 0,5 mm de espesor, 10 mm de longitud y 24 μL de volumen (Gertsel GmbH, Mülheim y der Ruhr, Alemania) previamente acondicionadas en tubos Gerstel limpios de desorción térmica a 300°C y 53,8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ de flujo de helio durante 1 h. El acondicionamiento se realizó en tandas de seis barras y se emplearon unas sesenta barras por experimento. Las barras fueron adheridas magnéticamente con pinzas (Gerstel) en la parte interna superior del recipiente hermético durante 1 h. Para evitar cualquier transferencia de aromas la manipulación de las barras con las pinzas se realizó siempre con guantes. Transcurrido este tiempo, las barras se retiraron con las pinzas y fueron devueltas a sus viales originales, etiquetados y almacenados en bolsas ZIP, dentro de contenedores de plástico herméticos (Curver Rodex SA Zaragoza, España) que contenían sílica gel. Las barras se guardaron a 4°C durante tres meses antes de la transferencia a un tubo de desorción térmica para el análisis de GC-MS según metodología derivada de Raffo et al. (2008). Los parámetros de ajuste y puesta a punto del método y la regeneración de la barras se hicieron según las recomendaciones de Gerstel. Las barras con aromas se introdujeron automáticamente en el dispositivo de desorción térmica (UDT), para ser desorbidas en splitless pero con un flujo de desorción alto en el liner (de Gerstel CIS4/Unidad de desorción de barras rellena de lana de cuarzo desactivada) del portal de inyección con temperatura programable (PTV) donde los analitos fueron atrapados criogénicamente antes de la posterior detección de los compuestos orgánicos adsorbidos en el recubrimiento de PDMS por el GC-MS.

Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases 6890 (Agilent Technologies), equipado con un sistema de enfriado de inyección (CIS4 PTV inyector) GERSTEL (Gerstel GmbH & Co. KG, Mülheim y der Ruhr, Alemania) y un muestreador MPS 2 (GERSTELMultiPurpose) con la opción de una unidad de UDT (GERSTEL Twister) y un detector selectivo de masas 5975 (Agilent Technol.).

Se utilizó helio de grado cromatográfico como gas portador. Para la UDT los parámetros utilizados fueron los siguientes: para el programa de desorción de 40 a 250°C (5 min) a 300°C $\cdot\text{min}^{-1}$; volumen del gas portador 45 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La configuración de la UDT fue en modo splitless con una temperatura de transferencia fija de 300°C y el modo de muestra estándar. La entrada trasera (CIS4) trabajó en modo de ventilación de solvente a una temperatura inicial de 250°C, 8,60 psi de presión, flujo de solvente 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, presión de ventilación de 7,25 psi, flujo de purga 9,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y un flujo

total de $13,3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Los parámetros de refrigeración criogénica fueron; enfriamiento del PTV a -100°C con un tiempo de equilibrado con nitrógeno líquido de 0,5 min, 0,1 min de tiempo de enfriamiento y 30 min de tiempo de espera criogénica. El programa de temperatura de refrigeración criogénica fue como sigue; la temperatura de inyección alcanzó los 250°C a $10^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$, y un tiempo de espera de 3 min. Se empleó una columna capilar ultra inerte HP-5MS (Agilent Technol.) ($0,25 \text{ mm} \times 30 \text{ m}$ de largo $\times 0,25 \mu\text{m}$). Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Retraso del solvente de 0,10 min; modo split (10:1); programa de temperatura del horno con un tiempo de equilibrio de 0,50 min y una rampa de 60°C a 240°C a $3^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. Se evitaron las altas temperaturas del horno para evitar el deterioro de la columna. La columna operó a presión constante a 7,25 psi, con un flujo nominal inicial de $0,9 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ y una velocidad promedio de $35 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Los cromatogramas y espectros de masas fueron evaluados utilizando el software ChemStation (G1701DA, Agilent) según la metodología descrita en el análisis de aromas en zumo de melón. La línea de transferencia, la fuente, y las temperaturas cuadrupolo se establecieron, respectivamente, a 280, 230 y 150°C .

Los espectros de masas fueron analizados en el rango de 30-400 m/z amu durante 60 min. La tasa de adquisición fue de cuatro $\text{scan} \cdot \text{s}^{-1}$. Las identificaciones se llevaron a cabo mediante la comparación de los índices de retención lineal (LRI) (calculado en relación con una serie homóloga de n-hidrocarburos) y los espectros de masas de la IE con datos publicados, o con datos de compuestos auténticos (de Sigma-Aldrich). La cuantificación de los picos identificados se llevó a cabo en el modo de escaneo completo y se determinó si el área del pico fue de alrededor de 3 veces la línea de base.

Solo se consideraron los compuestos reportados que tuvieron una calidad de identificación de espectro mayor de 60% en la base de datos de integración NIST. Para suprimir los compuestos no asociados a aroma de melón, se realizó una búsqueda profunda en la literatura y en internet. Los niveles de los compuestos volátiles se expresaron en porcentaje de la superficie total registrada en cada cromatograma y los datos se promediaron.

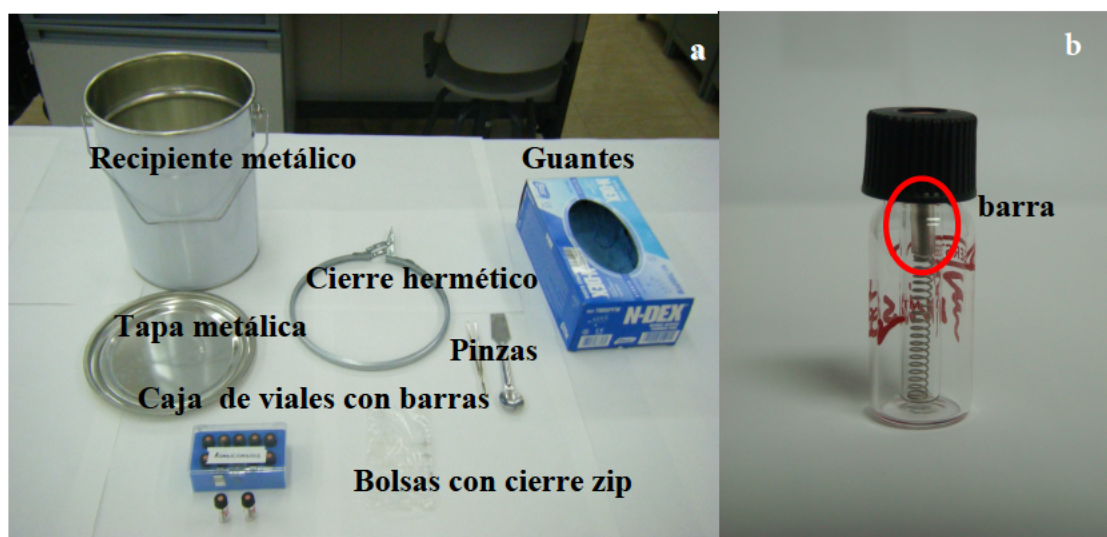


Figura 17. a) Material necesario para la toma de muestras de aromas en fruto entero de melón. b) Detalle de un vial portando una barra (twister) para la absorción aromas.

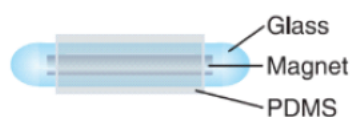


Figura 18. Twisters™ de un cm de largo recubierto de PMD (Imagen proporcionada por GERSTEL, Inc) (Skogerson et al. 2011).

8. Parámetros fisiológicos.

8.1 Tasa respiratoria y producción de etileno.

La tasa respiratoria (CO_2) y la producción de etileno (C_2H_4) se midió en frutos individuales utilizando contenedores herméticos de volumen 10,4 L (ERZ-10 Repli S.L., Rubí, Barcelona) en 2006, y 5 L (180 mm diámetro x 245 cm altura (Sunbox Distribution SL, Granollers, Barcelona, España) en 2008 y 2009, previamente calibrados con agua destilada. Se midió el peso y la densidad de cada fruto según metodología anteriormente descrita. Otros contenedores de diferentes volúmenes (entre 1 y 4 L) se emplearon dependiendo del tamaño del fruto. Las tapas de los contenedores tenían dos carriles de pared hermética de 14,73 mm \varnothing x 20,85 mm largo provistos de dos caños de $\frac{3}{4}$ de pulgada donde se adjuntó un tubo interior de silicona de 0,210 mm de diámetro (0,311 cm \varnothing externo, 0,21 cm \varnothing interno). Cada tubo tenía dos llaves de paso (Discofix-3, B, Braun Melsungen AG, Suiza), que fueron cerradas herméticamente tras poner la tapa. Las muestras de gas fueron tomadas por tabiques situados en estas

llaves de paso. Se midió la producción de etileno de cada fruto después de al menos 30 min dentro un contenedor a $18,6 \pm 1,1^{\circ}\text{C}$. Este tiempo fue fijado por ensayos preliminares para evitar el efecto inhibitorio del CO_2 sobre la producción de etileno tras una hora o más de acumulación en el que el C_2H_4 ya no era detectable. Los frutos se dejaban acumulando gas dentro de los contenedores hasta alcanzar una concentración mínima del 0,25% y máxima de 0,5% de CO_2 . Transcurrido el tiempo correspondiente, 30 min para C_2H_4 y entre 1,5 y 4 h para CO_2 (en función de la NIL y del espacio de cabeza de los contenedores) se tomaban dos muestras de 1 mL de gas con una jeringa de un mililitro (Tenemo, Lovaina, Bélgica) para el análisis del espacio de cabeza. Las jeringas se pinchaban inmediatamente sobre una tapa de goma sintética para evitar pérdidas y a continuación 0,5 mL de muestra fueron inyectados en el cromatógrafo de gases correspondiente.

La tasa de producción de etileno (C_2H_4) en 2006 y 2008 se midió en un cromatógrafo de gases (Thermo Trace Gas 2000, Ródano, Milán, Italia) conectado a un ordenador bajo sistema operativo Windows 98 con software Thermo (Chrom-Card 32-bit, Trace OCX, versión 4.2). El equipo constaba de un detector FID, un inyector split-splitless y una columna capilar (GS-Q de $30\text{ m} \times 0,530\text{ mm}$, J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., EE.UU). El volumen de inyección fue de 1 μL . La temperatura del horno fue de 60°C durante 2,2 min y luego se incrementó hasta 80°C con una rampa de $80^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. El tiempo de equilibrio fue de 0,5 min con una presión de 10,15 psi (70 Kpa). La temperatura del detector FID fue de 250°C y la temperatura de entrada de 200°C . El cromatógrafo de gases operó en modo split con un flujo de $90\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ (relación de split de 15 en 2006 y 10 en 2008). Se trabajó con un flujo de gases constante de $6\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ como resultado de una mezcla de aire sintético ($350\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), H_2 ($35\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$), N_2 (gas inerte) ($30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$) y He ($4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en 2006 y $12\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ en 2008). El rango de señal fue de 1. El tiempo medio de análisis fue 2,5 min.

En 2009 se la tasa de producción de etileno se midió en un cromatógrafo de gases (Agilent 7890A GC System, Agilent Technologies Inc., EE.UU) conectado a un ordenador bajo sistema operativo Windows Vista con software de Agilent (Agilent Chemstation Rev. B.03.02, EE.UU). El equipo constaba de un detector FID, un inyector split-splitless y una columna capilar (GS-Q de $30\text{ m} \times 0,530\text{ mm}$, J&W Scientific, Agilent Technologies Inc., EE.UU). El volumen de inyección fue de 1 μL . La temperatura del horno fue de 60°C durante 1,25 min y luego se incrementó hasta 80°C con una rampa de $80^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ y 0,5 min de tiempo de equilibrio del horno. La presión

fue de 10 psi. La temperatura del detector FID fue de 250°C con un flujo constante de gases resultado de una mezcla de aire sintético ($350 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), H_2 ($35 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$), N_2 (gas inerte) ($30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). La temperatura de entrada fue de 200°C con una presión de 10,385 psi. El cromatógrafo de gases operó en modo split con un flujo de $160 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (relación de split de 10). El gas portador fue helio con un flujo de $16 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. El tiempo medio de análisis fue 1,5 min. La señal FID fue de 50 Hz/.004 min.

En todas las campañas se usaron septums de 17 mm de silicona (BTO, Teknokroma, Barcelona, España) y se cambiaron aproximadamente cada 30 pinchazos o cuando fue necesario (una obstrucción en la jeringa indicaba la necesidad de cambiarlos).

La tasa respiratoria (CO_2) se midió (en 2006, 2008 y 2009) con dos cromatógrafos Thermo Trace GC 2000 (Ródano, Milán, Italia) con detector TCD y columnas de relleno de 2 m de longitud (Porapak N 80/100, Agilent J&W, EE.UU). Las condiciones de trabajo fueron 100°C de temperatura del horno durante tres min y unas condiciones post corrida de 160°C durante 0,5 min con una presión de 10,15 psi (70 Kpa). La temperatura del inyector y del detector TCD fue de 150°C. El flujo portador fue constante ($20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) y consistió en $10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de N_2 como gas inerte y $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ de He como referencia. El rango de señal fue de 1. El tiempo total de análisis fue 1,8 min con un tiempo máximo de equilibrado del horno de 0,4 min. Se emplearon septums de teflón (CC-12-ST2/P, Teknokroma) que se cambiaron diariamente o cuando fue necesario.

Cada día y tras el equilibrado de los cromatógrafos se pincharon al menos dos estándares de CO_2 , O_2 y C_2H_4 de $2 \pm 0,04\%$, $10 \pm 0,1\%$ y $1 \pm 0,1 \text{ ppm}$, respectivamente (Air Liquide, Murcia), para verificar la calibración de las columnas. El coeficiente de variación fue sobre 7% para CO_2 y 4,9% para C_2H_4 con un límite de detección de 0,04 ppm para etileno y 0,05% para la tasa respiratoria. Este método permitió detectar niveles de etileno de hasta $0,025 \mu\text{L C}_2\text{H}_4 \cdot \text{kg}^{-1}$ fruta.

Los cálculos de la tasa respiratoria ($\text{mg de CO}_2 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) y de la producción de etileno ($\mu\text{L de C}_2\text{H}_4 \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) fueron calculados según método estático de (Kader 2000) y programados en una hoja de cálculo en Microsoft Excel® 2000 (Fernández-Trujillo, no publicado). El peso y la densidad del fruto, el tiempo de permanencia en el contenedor hermético, la temperatura, el factor del gas, el área del cromatograma y la presión atmosférica (760 mm para Cartagena) fueron los datos necesarios para el cálculo.

9. Análisis estadístico.

La metodología del análisis estadístico ha sido ampliamente detallada en Dos-Santos et al. 2013 (véase apartado 2.5, capítulo 5). Los resultados fueron sometidos a numerosos análisis estadísticos univariante y multivariante en el entorno del software libre R versión 2.14.1 (2011-12-22) (*R Foundation for Statistical Computing*, Viena, Austria) y los paquetes FactoMineR (Husson et al. 2012), caret (Kuhn 2013) y randomForest (Liaw y Wiener, 2002) para análisis de componentes principales (PCA), análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) y random forest (RF) respectivamente.

Todos los compuestos volátiles para cada línea de melón se sometieron a análisis exploratorio de datos para detectar posibles valores atípicos o anómalos utilizando gráficos de caja-bigote y también gráficos de probabilidad normal para detectar posibles desviaciones de la normalidad. En el caso de ser necesario, se utilizó la familia Box-Cox de transformaciones para estimar las transformaciones de la normalización de cada variable univariante. Esta transformación se hizo para obtener residuos a partir del análisis de la varianza (ANOVA) lo más cerca a la distribución normal como sea posible (Box y Cox, 1964). Con el fin de aplicar este tipo de transformación en los casos con valores cero en los datos de entrada, se añade una constante para todos los datos observados.

Se realizó un ANOVA de una vía con el factor línea (ej. PS o SC7-1, etc). También se aplicó el test de tasa de falso descubrimiento (FDR) (Benjamini y Hochberg, 1995) para corregir los valores de P primos para la prueba múltiple. Cuando la línea fue significativa para $P \leq 0.05$, el mapeo de QTLs se llevó a cabo de acuerdo con Obando et al. (2008) mediante el establecimiento de diferencias significativas entre PS y cada NIL o línea según la prueba de Dunnett en $P = 0.05$. Los QTLs fueron mapeadas en la región LG previamente flanqueado por los marcadores moleculares (Eduardo et al. 2005).

Con el fin de aplicar diferentes análisis estadísticos multivariante para las variables volátiles individuales, los valores cero se sustituyen por el valor distinto de cero mínimo observado en el conjunto de datos y se realizó una transformación logarítmica (base 2) (Mathieu et al. 2009). Se utilizó PCA para un análisis descriptivo con el fin de determinar la estructura de los datos y detectar los datos de valores atípicos. Otras técnicas multivariante y métodos de clasificación empleados fueron PLS-DA y RF.

Estos métodos de clasificación son enfoques bien establecidos para manejar conjuntos de datos de grandes dimensiones y proporcionar las variables de medida de importancia para determinar la contribución de los compuestos volátiles aromáticos en la clasificación. Para PLS-DA, se examinó un total de dos componentes y cuatro criterios para medir la influencia de los compuestos volátiles de aroma en la clasificación. El primer criterio selecciona los volátiles más discriminantes según las dos primeras componentes (más del 50% de variabilidad explicada es decir, la distancia desde el origen superior a 0,7). Estas variables son importantes para describir la variabilidad en el conjunto de datos (Obando-Ulloa et al. 2008). El segundo criterio fue importancia de la variable en la proyección de puntuaciones (VIP) superior a un determinado umbral. El tercer criterio, importancia de las variables en la medida (VIM), se calculó sobre la base de sumas ponderadas de los coeficientes de regresión absoluta, donde los pesos son una función de la reducción de las sumas de cuadrados a través del número de componentes PLS. Por último, el cuarto criterio consiste en la selección de los principales compuestos que muestran pesos de carga absolutos superior a uno de los dos componentes PLS-DA (Quintás et al. 2012).

RF es un método de clasificación basado en una colección de árboles de decisión utilizando muestras del conjunto de datos aplicable a un gran número de variables de entrada. El análisis de RF proporciona dos medidas de importancia variable útil para cuantificar la contribución relativa de cada variable a la clasificación (Liaw y Wiener, 2002). El primero (RF1), se basó en descensos medios en la precisión y el segundo (RF2), se basó en el descenso de las medias en el índice de Gini. El escalamiento multidimensional (MDS) se utiliza para visualizar la disimilitud RF gráficamente.

CAPÍTULO III

DIFERENCIAS AROMÁTICAS ENTRE MELONES CLIMATÉRICOS DE DOS TIPOS Y NO CLIMATÉRICOS DEL TIPO 'PIEL DE SAPO'

Diferencias Aromáticas entre Melones Climatéricos de Dos Tipos y Melones No Climatéricos del Tipo 'Piel de Sapo'

Noelia Dos-Santos¹, Mari Carmen Bueso², Antonio José Monforte³ y Juan Pablo Fernández-Trujillo^{1,*}

*Equipo Multidisciplinar de Investigación en Calidad Postcosecha Orientada a
Mejora Genética y Biotecnología*

¹ Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Paseo Alfonso XIII, 48.

ETSIA e Instituto de Biotecnología Vegetal. 30203. Cartagena (Murcia).

Dpto. Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. Teléfono: 968 325436. E-mail:

juanp.fdez@upct.es.

² UPCT. Dpto de Matemáticas Aplicada y Estadística. C/Doctor Fleming s/n. ETSII. 30202 Cartagena.

³ IBMCP Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas. CSIC/Universidad Politécnica de
Valencia. Ciudad Politécnica de la Innovación - Edificio 8E Ingeniero Fausto Elio, s/n. 46022 Valencia,
España.

Resumen. Existen diferentes cultivares de melón aromáticos y climatéricos o no debido a diferencias en producción de etileno durante la maduración poscosecha. Los volátiles del parental 'Piel de Sapo' (PS) y de una variedad comercial ('Nicolás') sirvieron de referencia de no climatéricos, mientras que la línea casi-isogénica 6M1 y la línea 'Védrantais' fueron líneas aromáticas y climatéricas. El carácter climatérico se caracterizó por el contenido en ésteres (acéticos y no acéticos) y compuestos derivados del azufre, con mayor contenido en ésteres no acéticos (metil 2-metilbutanoato) en 'Védrantais'. Los melones no climatéricos se diferenciaron por un alto contenido en aldehídos como el 2-metilpropanal (mayor contenido en 'Nicolás'), terpenos, alcoholes y cetonas,

como la 2-butanona (mayor contenido en PS). Existe una influencia genética de la variedad en diferencias en biosíntesis y rutas metabólicas de aromas volátiles, especialmente en ésteres no acetato en variedades climatéricas con muy alta producción de etileno.

1. Introducción.

El comportamiento fisiológico de los frutos de melón como climatéricos o no climatéricos está determinado genéticamente aunque el control genético de la transición climatérica todavía no está completamente determinado (Vegas et al. 2012).

El aroma de la fruta es uno de los parámetros que más influyen en las preferencias del consumidor y es el resultado de una compleja mezcla con una amplia gama de compuestos con

diferente grado de volatilidad. Una importante contribución al aroma característico de la fruta y a la percepción de su calidad general depende de los ésteres y en cierta medida de los compuestos azufrados (Bauchot et al. 1998; Lucchetta et al. 2007; Verzera et al. 2010). En melones climatéricos, el aroma debido a los volátiles es un factor esencial de calidad vinculado al proceso de maduración y está controlado genéticamente (Dos-Santos et al. 2007; Gao et al. 2007; Nuñez-Palenius et al. 2008).

Existe un interés creciente por conocer marcadores moleculares asociados a atributos de calidad del melón, como el aroma, e identificar los Quantitative Trait Loci (QTLs) asociados al climaterio y la producción de etileno que están directamente relacionados con la vida comercial del fruto (Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008). En trabajos previos con líneas casi isogénicas (NILs) de melón (Ferrer et al. 2007; Obando-Ulloa et al. 2008) hemos determinado que la presencia de un QTL en el grupo de ligamiento III produce frutos aromáticos y con pulpa de un aroma retronasal diferenciado del tipo 'Piel de Sapo' (PS) no climatérico. Sin embargo, dentro de los melones climatéricos verificamos que hay

variabilidad en aromas (Obando-Ulloa et al. 2008). Igualmente existe interés por verificar si existen algunos aromas diferentes entre tipos no climatéricos 'Piel de Sapo' con fines de mejora genética.

La coexistencia de variedades de melón con maduración climatérica y no climatérica dentro de la especie, hacen que sea un sistema adecuado para estudiar el control genético de la maduración climatérica (Moreno et al. 2008). En Obando-Ulloa et al. (2008), solamente se consideró un perfil de 29 aromas volátiles comunes para diferenciar entre NILs climatéricas y no climatéricas, 'Vedrantais' y 'Nicolás', además de otras líneas. En el presente trabajo evaluamos todos los aromas detectados con microextracción en fase sólida (SPME) para verificar mayores diferencias y rutas metabólicas asociadas.

2. Material y métodos.

2.1 Material vegetal.

Los frutos procedieron de una colección de líneas casi-isogénicas ó NILs de melón ampliamente descrita (Eduardo et al. 2005; Moreno et al. 2008; Obando et al. 2008). El material vegetal consistió en dos tipos no climatéricos: un parental tipo español 'Piel de Sapo'

(*Cucumis melo* var. *inodorus* Naud cv. T111) y un melón híbrido var. 'Nicolás' (Syngenta Seeds). Respecto a los tipos climatéricos fueron: *C. melo* var. *cantalupensis* Naud, cv. 'Védrantais' y la línea casi-isogénica 6M1, con dos introgresiones (grupos de ligamiento III y VI) de la accesión coreana PI 161375 (SC) (*C. melo* L. cv. 'Shongwan Charmi' ssp grupo *conomon*) en el fondo genético del tipo PS (Eduardo et al. 2005; Moreno et al. 2008).

2.2 Manejo del cultivo y diseño experimental.

Las frutas de melón se recolectaron de plantas cultivadas en el Centro Integrado de Formación y Experiencias Agrarias (CIFEA) de la Consejería de Agricultura de la Región de Murcia en Torre Pacheco (Murcia) según manejo de cultivo, prácticas de cosecha e índices de recolección previamente descritos (Fernández-Trujillo et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009). Tres fueron las plantas por réplica y el número de frutos recolectados fue de n=7, salvo para PS con n=21. Se siguió un diseño experimental aleatorizado previamente descrito en Obando et al. (2008).

2.3 Comportamiento fisiológico.

La tasa respiratoria (TR) y la producción de etileno (PE) se determinó tras la cosecha en al menos cinco frutos individuales de diferentes réplicas según Fernández-Trujillo et al. (2008).

5.2.4 Muestreo de zumo y análisis de compuestos volátiles.

Los volátiles de zumo de melón se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) según metodología adaptada de Obando-Ulloa et al. (2008). El zumo de melón se preparó con una solución saturada de cloruro cálcico para bloquear las reacciones enzimáticas en el zumo (Buttery et al. 1987) y se almacenó en arcones congeladores a -80°C, ambas condiciones conservan mejor los compuestos volátiles. Posteriormente, el zumo previamente atemperado, se vertió en un vial de vidrio de 10 ml (Gerstel, Alemania) y se añadió patrón interno (10 µl de fenil-etil alcohol 0,01% v/v, Merck, España) como control. Los volátiles se analizaron por micro-extracción en fase sólida (SPME). Se empleó un cromatógrafo de gases HP 6890N GC serie II (Hewlett-Packard, Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, EE.UU) acoplado a un detector de masas HP 5973 (Hewlett-Packard). Se empleó

una columna de 78,5 mm × 6,5 mm × 0,75 mm diámetro interno (SPME/direct, Supelco, Bellefonte, PA, EE.UU). El flujo total fue 54,4 mL·min⁻¹. Los cromatogramas y los espectros de masas fueron evaluados manualmente usando el software ChemStation (G1701DA D.02.00.275, Agilent Technologies Inc, EE.UU). Los picos se identificaron con el espectrómetro de masas (5973 Network Mass Selective Detector, Agilent Technol.) acoplado al cromatógrafo de gases por comparación de espectros con el banco de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST05a.L, versión de búsqueda 2.0) (Obando-Ulloa et al. 2008).

Los volátiles se clasificaron en diez tipos de compuestos volátiles: alcoholes (ALC), aldehídos (ALD), cetonas (CET), terpenos (TER), ésteres acéticos (EA), ésteres no acéticos (ENA), compuestos derivados del azufre (CDA), ácidos (ACD), alcanos (ALC) y otros (OTH) en un formato especialmente diseñado en el software Excel por Fernández-Trujillo (datos no publicados) que añade las áreas de todos los compuestos volátiles identificados al tipo de compuesto correspondiente. Los resultados se expresaron en porcentaje respecto al área total de compuestos identificados previa

normalización de áreas respecto al estándar interno.

Los resultados de volátiles aromáticos individuales se normalizaron con el estándar interno y los resultados se expresaron como el porcentaje de área normalizada de cada compuesto dividido por el recuento de área total de los compuestos identificados. Las celdas vacías eran consideradas automáticamente como datos ausentes para el análisis estadístico. Los tiempos de retención de una serie de alcanos de cadena lineal (C6-C20) suministrados por Sigma se usaron en condiciones idénticas para calcular los índices de retención lineales para todos los compuestos volátiles identificados y su comparación con los datos reportados en la literatura por la base de datos del National Institute of Standards and Technology (NIST; <http://webbook.nist.gov/chemistry/cas-ser.html>).

2.5 Análisis estadístico.

Se determinó el poder discriminante de los aromas volátiles entre las cuatro líneas consideradas mediante diversos análisis estadísticos multivariante; análisis de componentes principales (PCA), análisis de escalamiento multidimensional (MSD), random forest (RF) y análisis de mínimos cuadrados

parciales (PLS-DA) entre otros, según metodología descrita (Fernández-Trujillo et al. 2009; Obando-Ulloa et al. 2008). Se empleó el programa JMP® v5.1.2 para Windows (SAS Institute Inc. NC, EE.UU) y el lenguaje R en el entorno de programación R v2.11.0 (2010-04-22). Si se encontraban diferencias significativas por ANOVA usando la línea, las diferencias entre NILs y PS fueron evaluadas por el test de Dunnett a $P = 0,05$, usando JMP (Obando et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2009). El elipsoide alrededor de cada centroide en los gráficos PLS-DA (*score plot*) se calculó para un intervalo de confianza del 95% con el paquete de elipses (Versión 0.3-4) en lenguaje R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria). Para los gráficos de correlaciones de PLS-DA, los círculos interno y externo de las figuras representan coeficientes de correlación $r=70\%$ y $r=100\%$ (o r^2 del 50% y 100%), respectivamente.

3. Resultados y discusión

3.1 Tasa respiratoria y producción de etileno.

Según los niveles de producción de etileno (C_2H_4) y de la tasa respiratoria (CO_2) (Fig. 1), y de datos previamente publicados (Fernández-Trujillo et al.

2008; Ferrer et al. 2007; Moreno et al. 2008), las líneas se clasificaron en tres categorías: No climatérica (PS y ‘Nicolás’), climatérica leve (6M1) y climatérica moderada (‘Védrantais’).

3.2 Compuestos volátiles aromáticos.

Ésteres acéticos y no acéticos y compuestos derivados del azufre fueron los compuestos mayoritarios de las líneas climatéricas 6M1 y ‘Védrantais’, mientras que aldehídos, alcoholes, cetonas y terpenos fueron mayoritarios en las líneas no climatéricas PS y ‘Nicolás’. La estadística multivariante (PLS-DA) de los grupos de volátiles, indicó que las dos líneas no climatéricas estuvieron muy próximas entre sí, con mayor contenido en aldehídos en el cultivar de referencia no climatérico ‘Nicolás’. Las líneas climatéricas estuvieron más alejadas entre sí, con mayor contenido en ésteres no acéticos en el cultivar climatérico ‘Védrantais’ (Fig. 2).

El eje PLSDA1 (60% de la varianza total explicada) discriminó las líneas climatéricas (por su contenido en ésteres acetato y derivados azufrados) de las no climatéricas (mayor contenido en cetonas, alcanos, alcoholes, terpenos y otros) (Fig. 2). El eje PLSDA2 (7,1% de la varianza total explicada) discriminó entre líneas, especialmente las líneas

climatéricas (6M1 más asociada a derivados azufrados y ‘Védrantais’ a ésteres no acetato). ‘Nicolás’ presentó más niveles de aldehídos que PS (más asociado a alcoholes) (Fig. 2). La inmensa mayoría de compuestos identificados en frutos de melón han sido alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, y compuestos azufrados. Estos compuestos dependen fuertemente de la variedad y del comportamiento fisiológico, siendo los frutos climatéricos de melón de mayor intensidad aromática y menor vida comercial que los frutos no climatéricos. Se demuestra por tanto que el contenido de compuestos volátiles responsables del “aroma de melón” es muy variado y es un atributo cultivar-dependiente, incluso teniendo similar comportamiento fisiológico (Aubert et al. 2006; Li et al. 2006; Luccheta et al. 2007; Nuñez-Palén et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008, 2010; Verzera et al. 2010). Los ésteres han sido establecidos como típicos compuestos volátiles en NILs climatéricas de melón mientras que los aldehídos son característicos de NILs no climatéricas (Obando-Ulloa et al. 2008).

No es descartable una interacción entre genotipo x ambiente variable con las campañas, o la presencia de QTLs muy dependientes del ambiente

(estaciones, método de cultivo), de acuerdo con los resultados en frutos de frambuesa (Paterson et al. 2013).

Respecto a aromas volátiles individuales (Tabla 1a; Fig. 3), las líneas climatéricas mostraron diferencias entre sí. La NIL 6M1 (climaterio leve) destacó por su contenido en nueve compuestos ésteres acetato (2-feniletil acetato, 3-acetilopropil acetato y 2-metilbutilacetato) principalmente, mientras que ocho compuestos discriminaron el cultivar ‘Védrantais’ (climaterio moderado), sobre todo ésteres no acetato como metil 2-metilbutanoato, butil propanoato y 2-metilpropil propanoato (Tabla 1a). Ésteres de cadena lineal, junto con ésteres de cadena ramificada derivados de la isoleucina fueron volátiles mayoritarios en las líneas climatéricas de acuerdo con (Bauchot et al. 1998). Estos ésteres junto a otros, son cuantitativamente los compuestos más importantes y contribuyen de forma importante al aroma único de frutas maduras de melón climatérico (Flores et al. 2005). El carácter climatérico estuvo fuertemente asociado a la producción de ésteres y compuestos derivados azufrados, lo que revela su dependencia al menos parcial de la acción del etileno. La catálisis de la enzima alcohol acetil transferasa (a partir

de alcoholes procedentes de aldehídos) y la producción de derivados azufrados a partir de metionina explicarían en parte este comportamiento (Luchetta et al. 2007ab; Varlet y Fernández, 2010). Los ésteres (acéticos y no acéticos) identificados en las líneas climatéricas 6M1 y ‘Védrantais’ se caracterizan por generar principalmente notas aromáticas afrutadas, florales, verdes, frescas, etéreas y dulces (Tabla 1b). La NIL 6M1 destacó también por su contenido en un compuesto derivado del azufre, el 3-metilsulfanilprop-1-ene, que genera notas aromáticas a aliáceas como el ajo y la cebolla (Tablas 1ab). En general, aunque depende de su concentración, los compuestos derivados del azufre se caracterizan por producir aromas indeseables o poco aceptados por los consumidores como el aroma a ajo, repollo cocido, mantequilla rancia o huevo podrido (Singh et al. 2003). Sin embargo, algunos de estos compuestos derivan en aromas indeseables en procesado excesivo de ciertos productos (ejemplo calentamiento demasiado tiempo), mientras que en procesado a cortos tiempos generan notas dulces.

Las dos líneas no climatéricas tuvieron un comportamiento similar en contenido en volátiles (Tabla 1a; Fig. 3), con alto contenido en alcoholes (ej. 3,5-

dimetilciclohexan-1-ol). El control PS destacó por su mayor contenido en cetonas como la 2-butanona, procedente de butano-2,3-diona y acetona; (Min 2012) y el 2-metilpropanal discriminó parcialmente ‘Nicolás’ de PS (Tabla 1a; Fig. 3). Este último es el precursor de los 2-metilpropil ésteres procedentes de la valina (Wyllie et al. 2005). Las notas aromáticas a afrutado y malta (junto a floral y chocolate) caracterizaron en general a los compuestos volátiles identificados en ‘Nicolás’ y PS (Tabla 1b). El metanotiol, un compuesto que actúa como precursor de compuestos derivados del azufre, ha sido identificado en las dos líneas no climatéricas Nicolás’ y PS (Tabla 1b). Este compuesto también ha sido identificado en estudios previos en NILs de melón (Obando-Ulloa et al. 2010) y en otros en alimentos como el queso o la langosta contribuyendo al característico aroma a azufre, col y repollo hervido (Singh et al. 2003; Varlet y Fernández, 2010).

4. Conclusiones

Parece existir alguna diferencia genética asociada a un mayor grado de climaterio y de ésteres no acetato como el metil 2-metilbutanoato en ‘Védrantais’ respecto a la línea casi-isogénica 6M1. La

NIL climatérica estuvo asociada a un mayor contenido en ésteres acéticos como el 2-metilbutilacetato. Las concentraciones de aldehídos como el 2-metilpropanal en el cultivar 'Nicolás' y cetonas como la 2-butanona en el parental 'Piel de Sapo', estuvieron asociadas al comportamiento no climatérico y discriminaron ligeramente entre las líneas PS y 'Nicolás', lo que soporta también una componente genética que podría integrarse a la mejora del aroma de los melones tipo 'Piel de Sapo'. La introgresión que produjo climaterio leve en 6M1 estuvo muy asociada a un QTL relacionado con la biosíntesis de ésteres.

Agradecimientos

Proyectos financiadores: AGL2010-20858 y AGL2003-09175-C02-02 (MICINN y MEC de España, respectivamente; UE-FEDER), CARM (BIO-AGR06/02-0011), y 11784/PI/09 (Fund. Séneca, Región de Murcia). NDSC agradece la beca predoctoral FPU-MEC AP2006-01565. Agradecemos a Semillas Fitó el suministro de semillas de PS, al IRTA-CRAG las de las NILs, y a Plácido Varó y su equipo del CIFEATorre Pacheco el manejo del cultivo realizado en sus instalaciones. Agradecemos a J. Obando, J.A Martínez,

C. Miranda, M.J. Ferrer y M.A. Quesada y al SAIT-UPCT la asistencia técnica.

Literatura Citada

- Aubert, C., Pitrat, M. 2006. Volatile compounds in the skin and pulp of Queen Anne's pocket melon. *J. Agric. Food Chem.* 54: 8177-8182.
- Bauchot, D.A., Mottram, D.S., Dodson, A.T., John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe Charentais melon (cv. Védrañtais). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787-4792.
- Buttery, R.G., Teranishi, R., Ling, L.C. 1987. Fresh tomato aroma volatiles: A quantitative study. *J. Agric. Food Chem.* 35: 540-544.
- Dos-Santos, N., Obando, J., Ostos, I., Melgarejo, L.M., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2007. Optimización de la extracción de ácidos orgánicos en pulpa liofilizada de melón y análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia. En Rabasseda, J. Martín de la Hinojosa, M.I. (Coord.). Actas del IV Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. Madrid,

- España. Ministerio de Cultura, Pesca y Alimentación, pp. 203-211.
- Eduardo I., Arús P., Monforte A.J. 2005. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon *Cucumis melo* L. from the exotic accession PI 161375. *Theor. Appl. Genet.* 112: 139-148.
- Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Martínez, J.A., Moreno, E., García-Mas, J., Monforte, A.J. 2008. Climacteric and non-climacteric behavior in melon fruit 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near-isogenic lines. *Postharvest Biol. Technol.* 50: 125-134.
- Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Monforte, A.J., Sanmartín, P., Kessler, M., Bueso, M.C. 2009. Métodos estadísticos multivariantes aplicables a estudios de calidad postcosecha del fruto de melón. En Alsina, I., Martín de la Hinojosa, M.I., Hooghuis, H. (Coord.). Actas V Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. Congreso V IBEROLAB. Min. Med. Amb. Medio Rural y Marino Madrid, España. pp. 13-21.
- Ferrer, M.J., Obando, J., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2007. Diferencias de calidad sensorial asociadas al comportamiento climático o no climático del melón mediante líneas casi isogénicas. Grupo de postrecolección y refrigeración-AITEP (Eds.), Cartagena, España. pp. 504-514.
www.horticom.com/pd/imagenes/68/929/68929.pdf
- Flores, F.B., Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Latché, A., Pech, J.C. 2005. Characterization of genes involved in the formation of aroma volatiles in 'Charentais' melon fruit. *Acta Hort.* (ISHS). 682: 673-679.
- Gao, H.Y., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Zhang, Y.L., Xie, Y.H., Li, Y.C., Luo, Y.B. 2007. Effect of suppression of ethylene biosynthesis on flavor products in tomato fruits. *Russ. J. Plant Physiol.* 54: 80-88.
- Li, Z., Yao, L., Yang, Y., Li, A. 2006. Transgenic approach to improve quality traits of melon fruit. *Sci. Hortic.* 108: 268-277.
- Lucchetta, L., Manrique, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., Ginies, C., Bouzayen, M., Rombaldi, C., Pech,

- J.C., Latché, A. 2007a. Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5213-5220.
- Lucchetta, L., Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F., Latché, A., Pech, J. 2007b. The role of ethylene in the expression of genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles in melon. En Ramina, A., Chang, C., Giovannoni, J., Klee, H., Perata, P., Woltering, E. (Eds.). *Advances in Plant Ethylene Research. Proceedings of the 7th international symposium on the plant hormone ethylene.* Springer, Dordrecht, Holanda. ch 4, pp. 189-195.
- Min, D.B. 2012. Flavor chemistry. OST 820 course. Ohio State Univ. <http://www.slideserve.com/flower/flavor-chemistry-820>
- Moreno, E., Obando, J., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García-Mas, J. 2008. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theor Appl. Genet.* 116: 589-602.
- Nuñez-Palenius, H.G., Gomez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G., Cantliffe, D.J. 2008. Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 13-55.
- Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Alarcón, A.L., Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J. 2008. Identification of quantitative trait loci of melon fruit quality traits. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 139-151.
- Obando-Ulloa, J., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A. J., Fernández-Trujillo, J. P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit. 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.
- Obando-Ulloa, J.M., Eduardo, I., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009. Identification of QTLs related to sugar and organic acid composition in melon using near-isogenic lines. *Sci. Hort.* 121: 425-433.
- Obando-Ulloa, J.M., Ruiz, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2010. Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon. *Food Chem.* 118: 815-822.

- Paterson, A., Kassim, A., McCallum, S., Woodhead, M., Smith, K. Zait, D., Graham, J. 2013. Environmental and seasonal influences on red raspberry flavour volatiles and identification of quantitative trait loci (QTL) and candidate genes. *Theor. Appl. Genet.* 126: 33-48.
- Singh T.K., Drake, M.A., Cadwallader K.R 2003. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci.* 2: 139-162.
- Varlet, V., Fernández, X. 2010. Review. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Sci. Technol. Intl.* 16: 463-503.
- Vegas, J., Rios, W., Sanseverino, A.J., Monforte, A.J., Garcia-Mas, J. 2012. Eth3.5 and eth6.3 control climacteric fruit ripening in the near isogenic line SC3-5-1. Cucurbitaceae 2012. Proceedings of the Xth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae, Antalya, Turquía, 15-18 Octubre, 2012. pp. 112-115.
- Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Ziino, M., Lanza, C.M., Mazzaglia, A. 2010. Fast quantitative determination of aroma volatile constituents in melon fruits by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Methods.* 4: 141-149.
- Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y., Shewfelt, R.L. 1995. Key aroma compounds in melons. En Roussef, R.L. and Leahy. M.M. (Eds.). Fruit flavors. ACS Symp. Ser. 596. Amer. Chem. Soc., Washington D.C., EE.UU. pp. 248-257.

Literatura citada en tablas.

1. Cann A.F., Liao J.C. 2010. Pentanol isomer synthesis in engineered microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 893-899. Access 16.10.2012.
2. Pherobase.
<http://www.pherobase.com/database>. Access 18.01.2013.
3. The Good Scent Company Database.
<http://www.thegoodscentcompany.com>. Access 26.10.2012.
4. Shen, C.R., Liao, J.C. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* 10: 312-320.

5. Atsumi, S., Hanai, T., Liao, J.C. 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* 451: 86-U13.
6. Wichaphon, J., Thongthai, C., Assavanig, A., Lertsiri, S. 2012. Volatile aroma components of Thai fish sauce in relation to product categorization. *Flavour Fragr. J.* 27: 149-156.
7. University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UMBBD). <http://www.umbbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=c&compID=c0175>. Access 18.11.2012.
8. Fauconnier, M.L., Marlier, M. 1997. Fatty acid hydroperoxides pathways in plants. A review. *Grasas y Aceites* 48 (1): 30-37
9. Mahattanatawee, K., Perez-Cacho, P.R., Davenport, T., Rouseff, R. 2007. Comparison of three lychee cultivar odor profiles using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-sulfur detection. *J. Agric. Food Chem.* 55: 1939-1944.
10. University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UMBBD). <http://www.umbbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=c&compID=c0407>. Access 07.11.2012.
11. Shabir, G.A., Bradshaw T.K. 2010. Determination of 1,7,7-Trimethyl bicyclo(2,2,1)heptan-2-one in a cream pharmaceutical formulation by reversed-phase liquid chromatography. *Indian J. Pharm. Sci.* 72: 809-814.
12. Flavornet and human odor space. <http://www.flavornet.org/flavornet.html>. Access 03.12.2012.
13. Smit B.A., Engels, W.J.M., Smit, G. 2009. Branched chain aldehydes: production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81: 987-999
14. Singh, T.K., Drake, M.A., Cadwallader K.R. 2003. Flavor of Cheddar Cheese: A Chemical and Sensory Perspective. *Compr. Rev. Food Sci.* 2: 139-162.
15. Toxicological Review of Methyl Ethyl Ketone (CAS No. 78-93-3). 2003. In Support of Summary

- Information on the Integrated Risk Information System (IRIS) September 2003 U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC. EE.UU.
16. Pang, X.L., Guo, X.F., Qin, Z.H., Yao, Y.B., Hu, X.S., Wu, J.H. 2012. Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation. *J. Agric. Food Chem.* 60: 4179-4185.
 17. Varlet, X., Fernández, X. 2010. Review. Sulfur-containing volatile compounds in sea food: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Sci. Tech. Int.* 16: 463-503
 18. Gunther, C.S., Heinemann, K., Laing, W.A., Nicolau, L., Marsh, K.B. 2011. Ethylene-regulated (methylsulfanyl)alkanoate ester biosynthesis is likely to be modulated by precursor availability in *Actinidia chinensis* genotypes. *J. Plant Phy.* 168: 629-638.
 19. Wikipedia 2013. http://en.wikipedia.org/wiki/Allyl_methyl_sulfide. Access 08.11.2012.
 20. Hayata, Y., Sakamoto, T., Maneerat, C., Li, X., Kozuka, H., Sakamoto, K. 2003. Evaluation of aroma compounds contributing to muskmelon flavor in Porapak Q Extracts by aroma extract dilution analysis. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3415-3418.
 21. Breme, K., Tournayre, P., Fernandez, X., Meierhenrich, U.J., Brevard, H., Joulain, D., Berdague, J.L. 2010. Characterization of volatile compounds of Indian Cress absolute by GC-Olfactometry/VIDEO-Sniff and comprehensive two-dimensional gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 58: 473-480.
 22. Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y.M., Shewfelt, R.L. 1995. Key aroma compounds in melons-their development and cultivar dependence. *Fruit Flavors* 596: 248-257.
 23. Rowan, D.D., Hunt, M.B., Alspach, P.A., Whitworth, C.J., Oraguzie, N.C. 2009. Heritability and genetic and phenotypic correlations of apple (*Malus x domestica*) fruit volatiles in a genetically diverse breeding

- population. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7944-7952.
24. Dávila-Aviña, J.E.D., González-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, J.F., Sepulveda, D.R., Olivas, G.I. 2011. Volatile compounds responsible of tomato flavor. *Rev. Fit. Mex.* 34: 133-143.
 25. Matich, A., Rowan, D. 2007. Pathway analysis of branched-chain ester biosynthesis in apple using deuterium labeling and enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2727-2735.
 26. Benincasa, C., De Nino, A., Lombardo, N., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. 2003. Assay of aroma active components of virgin olive oils from southern Italian regions by SPME-GC/ion trap mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 733-741.
 27. BioCyc Database Collection <http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=NIL&object=PWY-5410>. Access 22.11.2012.
 28. Trinh, T.T.T., Woon, W.Y., Yu, B., Curran, P., Liu, S.Q. 2010. Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *saccharomyces cerevisiae* and *williopsis saturnus*. *S. Afr. J. Enol. Vit.* 31: 116-124.
 29. Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Gepstein, S., Giovannoni, J.J., Katzir, N., Lewinsohn, E. 2010. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *J. Exp. Bot.* 61: 1111-1123.
 30. Goldenberg, L., Feygenberg, O., Samach, A., Pesis, E. 2012. Ripening attributes of new passion fruit line featuring seasonal non-climacteric behavior. *J. Agric. Food Chem.* 60: 1810-1821.
 31. Rossouw, D., Naes, T., Bauer, F.F. 2008. Linking gene regulation and the exo-metabolome: A comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* 9: 530

32. Nattaporn, W., Pranee, A. 2011. Effect of pectinase on volatile and functional bioactive compounds in the flesh and placenta of 'Sunlady' cantaloupe. *Int. Food Res. J.* 18: 819-827
33. KEGG PATHWAY. http://www.genome.jp/dbget-bin/show_pathway?map00640+C00207. Access 02.11.2012.
34. Wikipedia 2013. <http://en.wikipedia.org/wiki/Eucalyptol>. Access 13.12.2012.
35. Goodner, K.L., Mahattanatawee, K., Plotto, A., Sotomayor, J.A., Jordan, M.J. 2006. Aromatic profiles of *Thymus hyemalis* and Spanish *T. vulgaris* essential oils by GC-MS/GC-O. *Ind. Crops Prod.* 24: 264-268.
36. University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UMBBD). <http://www.umbbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=c&compID=c0115>. Access 14.11.2012.
37. Gross, B., Gallois, A., Spinnler, H.-E., Langlois, D. 1989. Volatile compounds, produced by the ligninolytic fungus *Phlebia radiata* Fr. (Basidiomycetes) and influence of the strain specificity on the odorous profile. *J. Biotechnol.* 10: 303-308.
38. Spanier, A.M. Flores, M., James, C., Lasater, J., Lloyd, S.W., Miller, J.A. 1998. Fresh-Cut pineapple (*Ananas* sp.) flavor. Effect of storage. En Contis, E.T, Ho C-T, Mussinan, C.J et al. (Eds.). *Food Flavors: Formation, Analysis and Packaging Influences*. Elsevier: Amsterdam, Holanda. 1998. pp. 331-344.
39. University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database (UMBBD). <http://www.umbbd.ethz.ch/servlets/pageservlet?ptype=c&compID=c0020>. Access 13.11.2012.
40. <http://books.google.es/books?id=BvnUeGikKN0C&pg=PA123&lp=PA123&dq=ISOPHORONE+biosynthesis+pathway&source=bl&ots=0yjfs448G7&sig=bV1MZA-y4OCSHz213gQJepwvug&hl=es&sa=X&ei=I9jIUJDaF4yPswbu9oHABg&ved=0CDkQ6AEwAzgK#v=onepage&q=ISOPHORONE%20biosynthesis%20pathway&f=false>. Access 21.11.2012.

41. University of Minnesota
Biocatalysis/Biodegradation
Database (UMBBD).
http://www.umbbd.ethz.ch/chx/chx_map.html. Access 01.12.2012.

Figuras y Tablas.

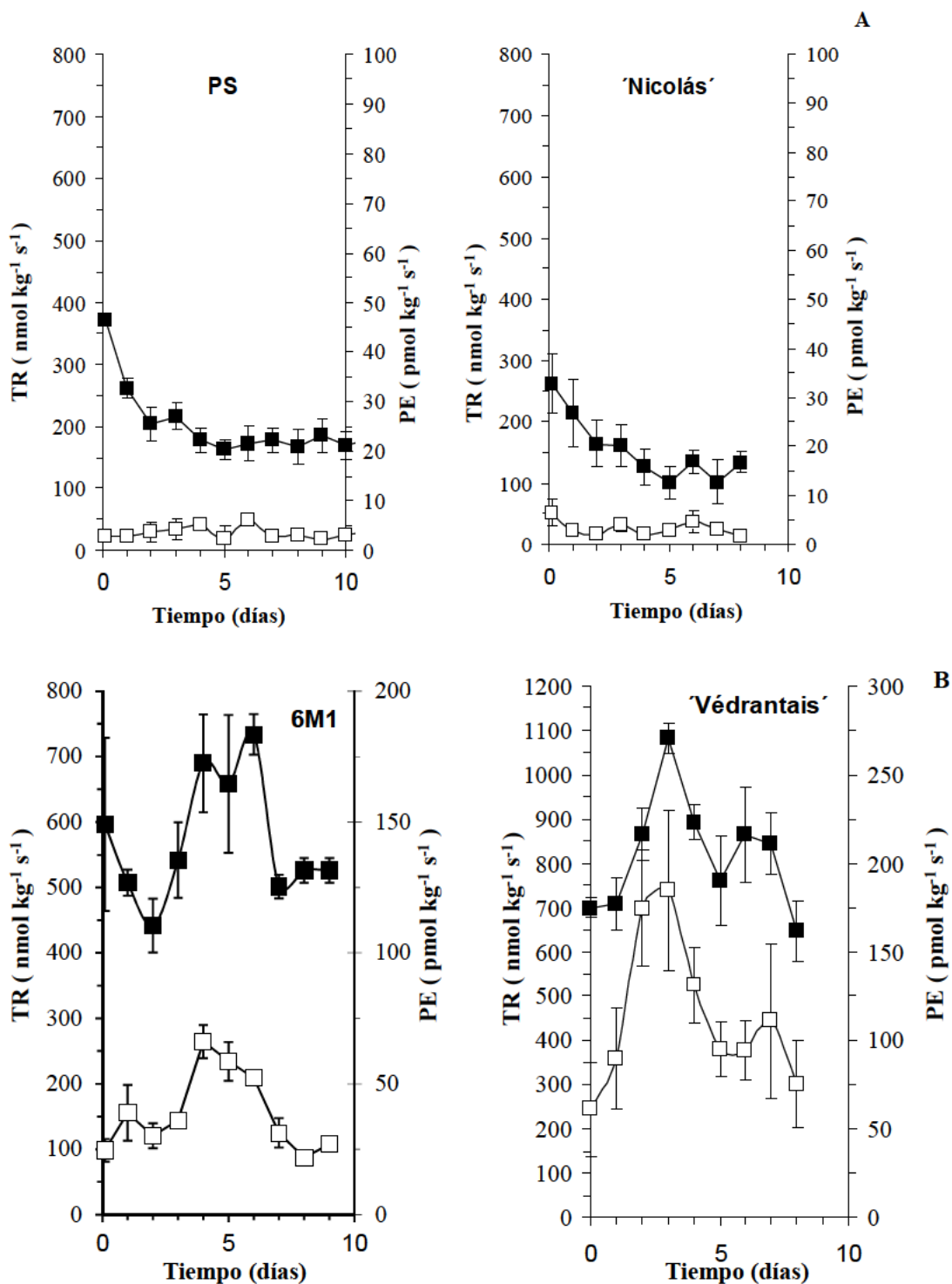


Figura 1. Tasa respiratoria (CO_2) y producción de etileno (C_2H_4) (TR, ■ y PE, □), respectivamente; media \pm DE) durante la maduración postcosecha a 21°C. **A.** Líneas no climatéricas PS y 'Nicolás'. **B.** Líneas climatéricas NIL 6M1 (climaterio leve) y 'Védrantais' (climaterio moderado).

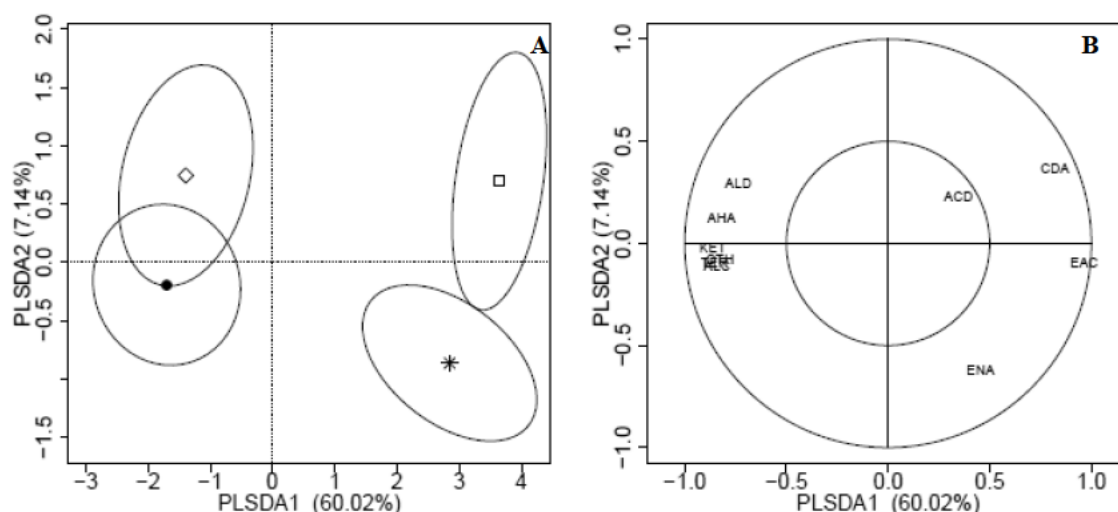


Figura 2. Discriminación de las diferentes líneas en función de las dos primeras componentes del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para grupos de compuestos (izquierda) en las variedades de melón en estudio: Línea casi-isogénica (NIL) 6M1 (□), los cultivares ‘Nicolás’ (◇) y ‘Védrantais’ (*) y el control parental PS (●). **A.** Centroides de las diferentes líneas y elipsoide al 95% de intervalo de confianza. **B.** Correlaciones entre los grupos de compuestos y las dos primeras componentes. Abreviaturas; Alcoholes (ALC), aldehídos (ALD), cetonas (KET), terpenos (TER), ésteres acetato (EAC), ésteres no acetato (ENA), compuestos derivados del azufre (CDA), ácidos (ACD), alcanos (AHA) y otros (OTH) (derecha).

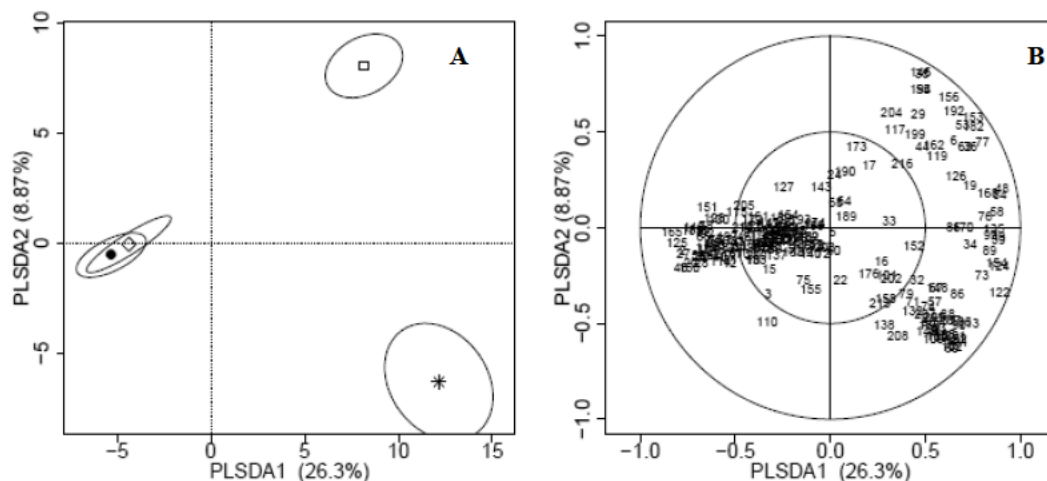


Figura 3. Discriminación de las diferentes líneas en función de las dos primeras componentes del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para compuestos aromáticos individuales en las variedades de melón en estudio: Línea casi-isogénica (NIL) 6M1 (□), los cultivares ‘Nicolás’ (◇) y ‘Védrantais’ (*) y el control parental PS (●). **A.** Centroides de las diferentes líneas y elipsoide al 95% de intervalo de confianza. **B.** Correlaciones entre los grupos de compuestos y las dos primeras componentes. Los números del gráfico de la derecha corresponden a los volátiles más discriminantes incluidos en el análisis, numeración según Tabla 1

Tabla 1a. Compuestos aromáticos probables identificados en el espacio de cabeza de los frutos de las líneas climáticas NIL 6M1 y cultivar 'Védrantais' y las líneas no climáticas cultivar 'Nicolás' y del control parental 'Piel de Sapo' (PS).

NÚMERO CAS	NOMBRE IUPAC	IDN	TR (min)	LRI. Cal.	LRI. Ref.	Ref.1	PS	'Nicolás'	6M1	'Védrantais'
ALCOHOLES										
000137-32-6	2-metilbutan-1-ol	36	3,337	s.d	722	1	0,00	0,00	0,09 *	0,04 *
000071-23-8	Propan-1-ol	10	1,555	s.d	548	1	0,08	0,00 *	0,00 *	0,01
005441-52-1	3,5-dimetilciclohexan-1-ol	112	13,535	996	n.e	-	0,33	0,26	0,09 *	0,04 *
000591-23-1	3-metilciclohexan-1-ol	92	10,502	941	n.e	-	0,23	0,14	0,05 *	0,01 *
001193-81-3	(2-metilciclohexil) metanol	128	16,669	1045	n.e	-	0,76	0,60	0,24 *	0,08 *
000104-76-7	2-Ethylhexan-1-ol	125	15,781	1031	1039	1	1,13	1,18	0,25 *	0,19 *
000076-22-2/000464-49-3	1,7,7-trimetilnorbornan-2-ona /(1R, 4R) 1,7,7-trimetilnorbornan-2-ona	165	21,091	1156	1151	1	0,82	0,83	0,25 *	0,14 *
ALDEHÍDOS										
000078-84-2	2-metilpropanal	7	1,573	s.d	552	1	0,00	0,11 *	0,01	0,02
CETONAS										
000078-93-3	Butan-2-ona	12	1,748	s.d	591	1	0,16	0,00 *	0,00 *	0,02 *
000078-59-1	3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona	131	17,257	1053	1118	1	0,00	0,00	0,00	0,04 *
007371-86-0	4-acetiloxipentan-2-il acetato	182	21,655	1193	n.e	-	0,03	0,00	0,85 *	0,35 *
COMPUESTOS DERIVADOS DEL AZUFRE										
010152-76-8	Sulfuro alil metil	156	20,871	1142	697	1	0,04	0,09	2,48 *	0,55 *
004455-13-4	Etil-2-metilsulfanilacetato	102	12,979	986	996	1	0,02	0,00	0,01	0,76 *
000074-93-1	Metanotiol	2	1,245	s.d	464	1	0,29	0,34	*	0,04 *
ÉSTERES ACETATO										
000628-66-0	3-acetiloxipropil acetato	153	20,653	1128	n.e	-	0,00	0,00	0,11 *	0,04 *
000624-41-9	2-metilbutil acetato	77	7,676	886	901	1	0,21	0,18	16,61 *	9,00 *
003681-71-8	[(Z)-hex-3-enil] acetato	121	14,453	1011	1016	1	0,00	0,00	0,14	5,01 *
000103-45-7	2-feniletil acetato	192	22,179	1263	1257	1	0,18	0,42	2,27 *	0,87 *
000140-11-4	Bencil acetato	168	21,419	1177	1165	-	0,31	0,48	4,60 *	4,17 *
000142-92-7	Hexil acetato	122	14,945	1018	1017	1	0,02	0,02	3,91 *	10,18 *

ÉSTERES NO ACETATO											
000868-57-5	Metil-2-metilbutanoato	49	4,195	790	780	1	0,00	0,01	0,80	*	1,19 *
000623-42-7	Metil butanoato	35	3,082	724	724	1	0,00	0,01	0,30	*	0,00
017094-21-2	Metil-2-metil-3-oxo-butanoato	146	19,650	1091	n.e	-	0,00	0,00	0,16	*	0,00
000540-42-1	2-metilpropil propanoato	73	7,197	874	868	1	0,00	0,00	0,07	*	0,18 *
000590-01-2	Butil propanoato	86	9,029	915	910	1	0,00	0,00	0,04	*	0,13 *
002311-46-8	Propan-2-il hexanoato	194	22,396	1297	1019	1	0,00	0,00	0,37	*	0,01
000109-21-7	Butil butanoato	198	13,771	997	997	1	1,96	1,75	0,43	*	0,42 *
TERPENOS											
000470-82-6	1,8,8-trimetil-7-oxabicyclo [2-2-2] octano	124	15,570	1028	1038	1	0,02	0,02	0,15	*	0,28 *
OTROS											
079637-11-9/000629-20-9	Etenilbenceno	78	12,685	981	988	1	4,34	3,03	1,34	*	0,63 *

El asterisco * indica diferencias significativas con el parental PS según test Dunnett a P = 0,05. Chemical Abstracts Service (CAS); International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Número identificativo de cada compuesto (IDN); Tiempo de Retención Promedio en minutos (TR PR min); Tiempo de Retención Lineal calculado (LRI Cal.); Tiempo de Retención Lineal Referenciado (LRI Ref.); Referencia LRI ref. (Ref.1); No encontrada (n.e); Sin dato (s.d); Ref.1, (1): National Institute of Standards and Technology (NIST; <http://www.nist.gov/index.html>).

Tabla 1b. Principales precursores y notas aromáticas de los compuestos aromáticos probables identificados en el espacio de cabeza de los frutos de las líneas climatéricas NIL 6M1 y cultivar 'Védrantais' y las líneas no climatéricas cultivar 'Nicolás' y del control parental 'Piel de Sapo' (PS).

NOMBRE IUPAC	IDN	PRECURSORES	Ref.2	NOTAS AROMÁTICAS	Ref.3
ALCOHOLES					
2-metilbutan-1-ol	36	AA	Iso	1	Malta, balsámico, vino, cebolla madura, mantecoso; Whisky, fusel, vino, 2, 3
Propan-1-ol	10	AA	Tre	4, 5	Afrutado, plástico, picante, rancio; Alcohólico, terroso, fermentado, fusel con matiz de nuez, cacahuete, así como matices afrutados de manzana, pera y chicle; Floral, dulce 2, 3, 6
3,5-dimetilciclohexan-1-ol	112	Ciclohexano		41	n.e
3-metilciclohexan-1-ol	92	AGs	Ac. Linolen.	7,8	Seco, disolvente, humedad, ron, fusel, afrutado 3
(2-metilciclohexil) metanol	128	n.e		n.e	n.e
2-Ethylhexan-1-ol	125	AG		9	Fruta cítrica, fresco, floral, dulce aceitoso, menta 3
1,7,7-trimetilnorbornan-2-ona	165	n.e		10	Fuerte olor aromático picante penetrante; Alcanfor; Alcanfor 3, 11, 12
ALDEHÍDOS					
2-metilpropanal	7	AA	Leu/Val	13	Verde, picante, malta, quemado, tostado, afrutado; Malteado, chocolate; Malta 2, 13, 14
CETONAS					
Butan-2-ona	12	Acetona/2-butanol		15, 39	Chocolate, químicos, gas, etéreo, queso, mantequilla; Verde, aldehído, recién pintado, etéreo 2, 38
3,5,5-trimetilciclohex-2-en-1-ona	131	Terpenos	V. Meval.	40	Alcanfor 16
4-acetiloxipentan-2-il acetato	182	n.e		-	n.e

COMPUESTOS DERIVADOS DEL AZUFRE						
3-metilsulfanilprop-1-ene	156	AA	Met	14, 17, 18	Aliáceas, ajo, cebolla; Ajo	3, 19
Etil (metiltio) acetato	102	AA	Met	14, 17, 18	Afrutado, Pepino	3, 20
Metanotiol	2	AA	Met	17, 21	Aceite vegetal, aliáceas, huevo, cremoso con matices salados	3
ÉSTERES ACETATO						
3-acetiloxipropil acetato	153	AA	Ala	22	Comida asada	38
2-metilbutil acetato	77	AA	Iso/Ala	20, 22, 23, 24, 25	Herbácea, etéreo, ron, fruta fermentada, plátano; Dulce, plátano, afrutado, maduro, bosque, y tropical con notas afrutadas	2, 3
[(Z)-hex-3-enil] acetato	121	AG	Ac. Linol.	26, 27	Dulce, verde, afrutado; Fresco, verde, dulce, afrutado con matices de manzana, pera y melón	2, 3
2-feniletil acetato	192	AA	Trip/Fen/Iso	22, 28	Aroma de pétalos de rosa	28
Bencil acetato	168	AA	Fen	29	Floral, quemado, calabacín cocido, dulce, afrutado, floral, jazmín; Plástico, verde	2, 21, 30
Hexil acetato	122	AG	Ac. Linolen.	23, 24	Afrutado, picante, herbal, vino dulce, gomoso, tabaco, acidulado, cítrico, verde, hierbas; Manzana, cereza, pera, floral; Manzana, cereza; Dulce, graso, fresco, pera	2, 30, 31, 32
ÉSTERES NO ACETATO						
Metil-2-metilbutanoato	49	AA	Iso	22, 23, 29	Manzana, frutas, alcohol, solvente, chicle; Etérea, afrutado, tutti frutti y maduro con un matiz graso, verde; Afrutado, dulce, manzana	2, 3, 32
Metil butanoato	35	AA	Iso	22	Acre, etéreo, frutal, perfumado y fusel con una nota fermentada, cremosa; Acre, perfume, fermentado; Afrutado, manzana	3, 30, 32
Metil-2-metil-3-oxo-butanoato	146	AA	Iso	22	n.e	
2-metilpropil propanoato	73	AA	Cis/Met	33	Afrutado, dulce, ron, bosque, picante, goma de mascar, bosque con un matiz tropical	3
Butil propanoato	86	AA	Cis/Met	33	Dulce, bosque, plátano, maduro, tutti-frutti, lifting, brillante, cereza, ron	3
Propan-2-il hexanoato	194	n.e		n.e	Afrutado, piña, frambuesa	3
Butil butanoato	198	AA/ AG	Ala	22	Fresco, dulce, afrutado	2
TERPENOS						
1,8,8-trimetil-7-oxabicyclo [2-2-2] octano	124	Terpenos		34, 35	Eucalipto, hierbas, alcanfor, dulce, mentol	3

OTROS			
Etenilbenceno	78	Etilbenceno	36
Dulce, balsámico, floral, plástico; Balsámico, gasolina			
3, 12			
Chemical Abstracts Service (CAS); International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC); Número identificativo del compuesto (IDN); Referencia precursores (Ref.2); Referencia notas aromáticas (Ref.3); Ácidos Grasos (AG): Ácido Linolénico (Ac. Linolen.), Ácido Linoleico (Ac. Linol.); Aminoácidos (AA): Alanina (Ala), Cisteína (Cis), Fenilalanina (Fen), Isoleucina (Iso), Leucina (Leu), Metionina (Met), Treonina (Tre), Triptófano (Trp), Valina (Val); No encontrado (n.e); Vía del mevalonato (V meval.).			

CAPÍTULO IV

***CELL WALL POLYSACCHARIDES OF NEAR-
ISOGENIC LINES OF MELON (CUCUMIS
MELO L.) AND THEIR INBRED PARENTALS
WHICH SHOW DIFFERENTIAL FLESH
FIRMNESS OR PHYSIOLOGICAL BEHAVIOR***

Cell Wall Polysaccharides of Near-Isogenic Lines of Melon (*Cucumis melo* L.) and Their Inbred Parentals Which Show Differential Flesh Firmness or Physiological Behavior

Noelia Dos-Santos,[†] Ana Jiménez-Araujo,[‡] Rocío Rodríguez-Arcos,[‡] and J. Pablo Fernández-Trujillo^{*,†}

[†]Department of Agricultural and Food Engineering, Technical University of Cartagena (UPCT), Campus Paseo Alfonso XIII, 48, ETSIA and Institute of Plant Biotechnology, E 30203 Cartagena (Murcia), Spain

[‡]Department of Food Biotechnology, Instituto de la Grasa, Advanced Scientific Research Council (IG CSIC), Apartado 1078, E 41012 Sevilla, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: We characterized differences in cell wall material and polysaccharide structures, due to the quantitative trait loci associated with higher flesh firmness in a nonclimacteric near isogenic line (NIL) SC7 2, and with the climacteric behavior of the NIL SC3 5 1, using their nonclimacteric inbred parentals, “Piel de Sapo” (PS) and PI 161375 (SC). PS was firmer and had a higher ripening index and greater hemicellulosic content than SC, with its lower wall material yield, and uronic acid, neutral sugar, cellulose and free sugar content and higher pectic content. SC3 5 1 showed lower uronic acid values, a higher soluble solid content, and similar flesh firmness to PS. SC3 5 1 yielded mainly high molecular weight polysaccharides in the imidazole soluble fraction than PS. SC7 2 showed greater flesh firmness, a higher neutral sugar (especially galactose and mannose) and uronic acid content, together with a larger cellulose and α cellulose residue than PS. SC7 2 also contained more polysaccharides of low molecular weight in the first pectic fraction and shifted toward higher molecular weights in the main peak of the 4 M potassium soluble fraction compared with PS.

KEYWORDS: *Cucumis melo* L, chemical fractionation, glycosidic composition, fruit ripening, flesh firmness, climacteric behavior

INTRODUCTION

The cell wall is a complex and dynamic structure which acts as a structural and mechanical support for the plant body and plays an important role in fruit textural changes,^{1,2} being a key but not unique component of fruit texture characteristics.³ The degree of primary cell wall degradation is an important factor in fruit tissue integrity that is affected by the composition and structure of middle lamella polysaccharides, the cuticle and the turgor generated within the cell walls by osmosis.^{4–7}

The pectins, hemicellulose and cellulose, are the main cell wall polysaccharides susceptible to solubilization, depolymerization and de esterification by different cell wall modifying enzymes during fruit ripening and storage.^{8–10} Overall during melon ripening there is a shift to a lower molecular mass distribution of hemicellulose polymers and a substantial degree of solubilization and depolymerization of pectins, especially the water soluble pectins.⁵ Cell wall changes associated with fruit softening during ripening can be divided into two sequential stages. The first occurs during early fruit ripening and is associated with the disassembly of xyloglucan polymers through the action of cell wall hydrolases and, especially, expansin proteins. The second stage occurs in the late stage of ripening and is related to disassembly of the pectin network. These processes occur in a temporal overlap, but in some climacteric melons, such as “Charentais”, pectin disassembly occurs late in ripening and after xyloglucan disassembly, while polygalacturonases appear to be present during pectin disassembly, albeit at very low levels.^{5,11}

Texture is one of the most important quality parameters and is partly responsible for consumer preferences of edible fruit,¹²

while softening is a determining factor in the quality and postharvest life of fruit.^{4,9} The softening process has ethylene dependent and independent components,^{13,14} but rapid melon softening often correlates with autocatalytic ethylene production and the degradation of cell wall polymers.¹⁵ Endopolygalacturonase (PG, EC 3.2.1.15), one of the enzymes responsible for polyuronide depolymerization and solubilization during ripening, shows the genetic expression of different subunits that are either dependent or independent of ethylene action.^{13,16} Cell wall modifying enzymes are synthesized by a large family of genes that plays an important role in fruit metabolism during melon ripening. For example, pectin methylesterase (PME) contributes to the action of polygalacturonase, converting methyl esterified pectins into substrates upon which these enzymes could act.¹⁷

Candidate genes for several quantitative trait loci (QTL) associated with fruit softening have been identified in melon.¹⁸ Previous results indicate that certain near isogenic lines (NILs) of this collection undergo a similar softening process, although the initial value of whole fruit firmness and variability in the senescence end point are critical.^{18–20} Therefore, study of the cell wall composition of both NILs and its parentals at this point may help us to characterize the possible effect of the QTL on the cell wall during ripening. Our null hypothesis is that melon QTLs associated with differences in texture and climacteric affect cell wall composition.

Received: September 10, 2010

Accepted: May 24, 2011

Revised: May 19, 2011

Published: May 24, 2011

MATERIALS AND METHODS

Plant Material and Experimental Design. The plant materials used were melon near isogenic lines or NILs and their nonclimacteric parents, the Spanish melon *Cucumis melo* L. cv. "Piel de Sapo" (PS) and the Korean accession PI 161375 "Shongwan Charmi" (SC).²¹ The NILs evaluated were the climacteric NIL SC3 5 1 and the nonclimacteric NIL SC7 2. Both NILs contain introgressions of SC into PS genetic background according to the first number, which refers to the linkage group with the introgression^{18,21} (A. J. Monforte, Institute of Molecular and Cellular Biology of Plants, Valencia, Spain, personal communication). The fruits were harvested in two consecutive seasons (2008 and 2009). Crop management, harvest practices and other details have been reported previously.^{14,22} The field was divided into blocks in a completely randomized design within each block. The distance between rows was 2 m and between plants 1.5 m. Each replicate consisted of three plants separated 1.5 m from the other replicates (in 2008) or six plants (three in two adjacent rows) with the same separation between replicates (in 2009). Fruit were harvested throughout both seasons according to the maturity indices previously described.¹⁴ The quality traits reported below were evaluated in both seasons using at least two fruits per replicate as follows: In season 2008, SC $n = 10$, in PS $n = 21$, in SC3 5 1 $n = 7$ and in SC7 2 $n = 6$. In season 2009, SC $n = 6$, in PS $n = 9$, in SC3 5 1 $n = 9$ and in SC7 2 $n = 7$.

Physiological Behavior Evaluation. Respiration rate and ethylene production were measured at harvest (optimum stage of maturity) in at least five individual fruits of different replicates according to Fernández Trujillo et al.²³

Sampling and Sample Preparation for Extraction of Cell Wall Material (CWM). In cell wall experiments, four lines were analyzed, with three replicates per line and year. Depending on the fruit size, two to eight selected fruits per replicate were used for obtaining the fresh melon flesh as follows. Fruits were peeled, and the seeds and placental tissue were removed with a stainless steel knife. The flesh was cut into pieces, weighed and stored in zip closure bags in a freezer at 25 °C.

Cell Wall Material Isolation. CWM was obtained by adapting the methodology of Selvendran²⁴ to melon fruit. Samples were first extracted with 96% v/v ethanol (four volumes per unit of flesh fresh weight). Samples were ground with a mixer (Orione Mod 0.7 kg, Sirman spa, Venice, Italy), homogenized (Ultraturrax T25 Janke and Kunkel, Ika Labor Technik, Funkentsört, Germany) and filtered, and the remaining pellet was treated again with 80% v/v ethanol. Subsequently, the pellet was washed with acetone until it became white and finally air dried and stored at 20 °C until analysis. An aliquot of the ethanol soluble fractions was kept at 4 °C until subsequent analysis.

Extraction of Polysaccharide Components. Cell wall polysaccharides were fractionated into four groups and the final α cellulose residue (α CEL). The first two extracts were two pectic fractions: the imidazole soluble fraction (ISF) and carbonate soluble fraction (CSF). The next two were the hemicellulosic fractions: the 1 M potassium soluble fraction (K1SF) and 4 M potassium soluble fraction (K4SF). One gram of CWM was sequentially extracted according to Jiménez et al.^{25,26} with slight modifications in the solutions and concentrations used: (a) 0.5 M imidazole/hydrochloric acid, 10 mM in metabisulfite (Fluka puriss, Buchs, Switzerland) (two times, 250 mL) for 4 h at room temperature in the first extraction and 18 h in the second, and washed with distilled water (250 mL) (ISF); (b) 0.05 M sodium carbonate (Sigma, Barcelona, Spain), 20 mM in sodium borohydride (Panreac, Barcelona, Spain) (two times, 250 mL) for 18 h at 4 °C and 4 h at room temperature and washed (CSF); (c and d) 1 and 4 M potassium hydroxide (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM in sodium borohydride (Panreac) (two times, 250 mL) for 18 h at 4 °C, 4 h at room temperature and washed (K1SF and K4SF). The fractions CSF, K1SF

and K4SF were neutralized with glacial acetic acid (Merck) to pH 6. The final α CEL obtained and the four fractions (ISF, CSF, K1SF and K4SF) were dialyzed in dialysis tubing of molecular weight cutoff (MWCO) 12000 Da (cellulose membrane, Sigma Chemical CO., St. Louis, MO) against water. Conductivity was measured (Hanna Instruments HI 8819N, Ann Arbor, MI) checking that the washing water reached a conductivity below 100 μ S/cm. Fractions were frozen at 25 °C and lyophilized (Flexi Dry MP Freeze Dryer, FTS Systems Inc., Stone Ridge, NY) for glycoside analysis.

Polysaccharide Analysis. The glycosidic composition of the different fractions was determined by acid hydrolysis with 2 N trifluoroacetic acid (Sigma Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Germany) (121 °C, 1 h),²⁷ derivatization to alditol acetates and quantification by gas chromatography.²⁸

A HP 6890 Plus+ gas chromatograph (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) fitted with a 30 m \times 250 μ m \times 0.20 mm capillary column (SP 2330, Supelco, Bellefonte, PA) was used. The carrier gas was helium with a constant flow equal to 2.2 mL/min, pressure 21.5 psi (148.24 kPa). Injection was performed in splitless mode. The oven temperature was held at 50 °C for 2 min after injection, then programmed to 180 at 35 °C/min, held at 180 °C for 5 min, and then immediately increased to 220 at 5 °C/min, and held at 220 °C for 22 min. Total run was 40.7 min. The injector temperature was 250 °C, flame ionization detector (FID), 300 °C. Neutral sugars (NS) L rhamnose (Rha), D fucose (Fuc), L arabinose (Ara), D xylose (Xyl), D mannose (Man), D galactose (Gal) and D glucose (Glc) were identified. *myo* Inositol was used as internal standard.

The residue of the α cellulose fraction after trifluoroacetic acid hydrolysis was treated with 72% H₂SO₄ (Panreac) for 2 h according to Jiménez et al.²⁶ to quantify its cellulose content. The glucose in the hydrolysates was colorimetrically quantified by the anthrone assay.²⁹ Uronic acids (UA) were quantified by the *m* hydroxybiphenyl method.³⁰ The absorbance values of standards and samples were measured at 630 and 540 nm, respectively, in a microplate reader (MPM 600; Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

High-Performance Size Exclusion Chromatography (HPSEC). Analysis of the Molecular Weight (MW) of the Polysaccharides. The method used for HPSEC analysis was that described by Jiménez et al.²⁵ with slight modifications. Polysaccharidic fractions (ISF, CSF, K1SF and K4SF) from the 2009 season were analyzed for MW determination after desalting with PD 10 columns (Supelco). The MW was measured in Jasco equipment (LC Net II ADC, Kyoto, Japan) with a refractive index detector (Jasco RI 1530) and injection valve (Rheodyne, loop 20 μ L, Cotati, CA). Two different columns in sequence were used: TSKgel GMPWxl and TSKgel G3000PWxl (300 \times 7.8 mm i.d., Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA) after calibration with 250, 110, 70, 40, 6 kDa and glucose (Fluka, Buchs, Switzerland). Blue dextran was used to test the void volume (V₀) of the column. The elution buffer was 0.05 M tris hydrochloric acid and 0.2 M sodium chloride at a flow rate 0.4 mL/min. Fractions of 250 μ L were collected using a Redifrac fraction collector (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Fractions were assayed for NS by the Dische method,²⁹ and absorbance values were measured at 630 nm in a microplate reader (MPM 600, Bio Rad). Peaks above 250 kDa or below 6 kDa were considered to be of high and low MW, respectively, throughout the manuscript.

Quality Traits. The weight, equatorial and longitudinal diameter of each individual fruit was measured according to Fernández Trujillo et al.³¹ and Obando et al.²² Whole fruit hardness (in N/mm) was measured at a selected point of the equator of the fruit by a compression test of 2 mm deformation according to Tijskens et al.²⁰ Flesh firmness was measured in cylinders (20 \times 15 mm) by using a 1.6 mm wide probe adapted to a testing machine.³¹ Flesh juiciness, juice density and total soluble solids (in °Brix) were measured according to Obando et al.²² Flesh juiciness and the pellet content of the juice after centrifugation are expressed in grams of juice per kg fresh weight or juice, respectively.

Table 1. Fruit Quality Traits of the Parental Lines and NILs of Melon Obtained from Two Consecutive Seasons (2008 and 2009)^a

parental line or NIL	soluble solids (°Brix)	flesh firmness (N)	whole fruit hardness (N/mm)	pellet content of the juice (g/kg)	flesh juiciness (g/kg)
Season 2008					
PS	9.60 a	7.30 a	83.36 ac	28.94 a	355.77 a
SC	7.76 a	6.97 ab	24.79 bc	26.33 a	326.93 b
SC3-5-1	10.81 b*	6.23 b	28.91 b	40.95 b*	356.15 a
SC7-2	9.15 a	11.51 c*	58.19 c	30.04 a	327.34 a
Season 2009					
PS	11.92 a	5.66 a	64.04 a	22.82 a	295.81 a
SC	5.32 b	6.21 a	13.99 b	39.53 b	435.44 b
SC3-5-1	13.53 c*	6.22 a	32.55 b	46.83 b*	276.36 a
SC7-2	12.01 a	9.21 b*	54.98 c	30.54 a	161.12 c*

^aResults were statistically analyzed per individual season. Means of each attribute followed by different letters in the same column (a–d) are significantly different according to the LSD test (p value = 0.05). The NIL means followed by an asterisk are significantly different from PS according to the Dunnett test (p value = 0.05).

Statistical Analysis. Quality traits and cell wall components data were subjected to univariate analysis of variance using cultivar as a single factor. If means within the cultivars were significantly different, they were separated by a Tukey–Kramer HSD test (quality traits) and LSD test (cell wall components) at p = 0.05. All the comparisons of quality traits of the NILs were made with PS, using JMP 5.1 software (SAS Institute Inc., Cary, NC), according to a Dunnett test (p = 0.05), because they share the same genetic background.

RESULTS

Quality, Physiological Behavior and Cell Wall Material of the Parental Lines (PS and SC). PS showed higher soluble solid levels and a greater pellet content proportion in the juice compared with SC. The same was true for whole fruit hardness (>70% higher in PS than SC), but flesh firmness values were similar (Table 1). The respiration rate and ethylene production pointed to nonclimacteric behavior in both parentals (data not shown).

The CWM of the replicates of all lines was combined every year for subsequent extraction because of the sparse differences detected between replicates (data not shown). Cell wall components and CWM yield were higher in PS than in SC (Table 2).

Glucose and galactose were the main neutral sugars in cell wall material in both parentals while the highest values of the rest of sugars corresponded to xylose and arabinose. PS showed higher values of Glc and Gal and lower values of Ara and Rha than SC (Table 3). The characterization of pectic and hemicellulosic fractions reported below outlines the main differences between parentals (Tables 4 and 5).

Cell Wall Fractions. *Pectic Fraction and Parental Lines.* The ISF and CSF of the parental lines were rich in pectic polysaccharides (UA, Gal and Ara). Overall, the parental lines showed similar profiles in the pectic fractions and similar HPSEC results, with some exceptions.

In ISF, PS had a higher fucose (25–50%) and xylose (18–49%) content than SC (Figure 1). Polysaccharides with a molecular

Table 2. Cell Wall Material (CWM) Composition of the Parental Lines and NILs of Melon Obtained from Two Consecutive Seasons (2008 and 2009)^a

parental line or NIL	yield of CWM ^b	free sugars ^b	NS ^c	UA ^c	CEL ^c
Season 2008					
PS	0.86 acd	5.90 a	68.11 abd	201.15 a	271.67 a
SC	0.67 b	5.22 a	61.51 b	159.53 b	209.30 b
SC3-5-1	0.80 c	5.95 a	47.16 c	170.80 c	222.78 c
SC7-2	0.95 d	4.84 a	77.52 d	220.59 d	288.23 a
Season 2009					
PS	0.93 a	9.27 a	56.30 a	157.68 a	178.01 a
SC	0.54 b	3.83 b	42.93 b	108.72 b	132.43 b
SC3-5-1	1.01 a	10.01 a	68.05 c	144.43 a	210.10 c
SC7-2	1.04 a	9.98 a	95.70 d	179.62 c	255.97 d

^aResults were analyzed per individual season. ^bResults are expressed in g/100 g of fresh weight and are the average value of three replicates.

^cResults are expressed in mg/100 g of fresh weight and are the average value of three replicates. Means of each attribute followed by different letters in the same column (a–d) are significantly different according to the LSD test (p value = 0.05). The NIL means followed by an asterisk are significantly different from PS according to the Dunnett test (p value = 0.05).

Table 3. Neutral Sugar Composition Cell Wall Material of the Parental Lines and NILs of Melon Obtained from Two Consecutive Seasons (2008 and 2009)^a

parental line or NIL	neutral sugars ^b						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Season 2008							
PS	2.9 ab	2.6 a	5.2 a	8.4 ab	4.5 ac	25.4 a	18.1 a
SC	3.3 ab	2.5 a	8.6 b	9.6 ab	4.2 a	18.7 b	11.4 b
SC3-5-1	2.5 a	1.9 a	4.1 a	7.2 a	3.1 b	14.9 b	13.4 b
SC7-2	4.0 c	4.0 b	5.2 a	10.6 b	5.0 c	32.4 c	16.3 ab
Season 2009							
PS	1.7 a	1.4 a	5.3 a	9.4 a	3.5 a	13.1 a	21.8 a
SC	2.0 a	1.0 a	7.7 b	8.4 a	4.7 ab	10.3 b	7.8 b
SC3-5-1	1.9 a	1.2 a	5.4 a	9.5 a	4.5 ab	15.7 c	31.9 c
SC7-2	3.9 b	2.1 b	7.5 b	16.8 b	5.8 b	27.5 d	30.5 c

^aResults were analyzed per individual season. ^bResults are expressed in mg/100 g of fresh weight and are the average value of three replicates. Means of each attribute followed by different letters in the same column (a–d) are significantly different according to the LSD test (p value = 0.05).

weight above 250 kDa or below 6 kDa in ISF were lower (or undetectable) in PS than in SC (Figure 2). In CSF, the parentals had high UA values and significant amounts of arabinose, galactose and rhamnose, homogalacturonans being the main components of this fraction. SC showed higher Rha and Ara values than PS (Figure 3). In the CSF, a dense gel was formed when the HPSEC elution buffer was added.

Hemicellulosic Fraction and Parental Lines. The K1SF and K4SF showed higher percentages of glucose and xylose (Figures 4 and 6). In general, in both lines the percentage of uronic acids (30–53% in K1SF and 14–18% in K4SF) was lower in

Table 4. Relative Percentage (%) of Polysaccharides in Pectic [Imidazole Soluble Fraction (ISF) and Carbonate Soluble Fraction (CSF)] and Hemicellulosic [1 M Potassium Soluble Fraction (K1SF) and 4 M Potassium Soluble Fraction (K4SF)]. Fractions of Cell Wall Material and Percentages of the Sum of Pectins and Hemicelluloses ($\Sigma P + \Sigma H$) in the Parental Lines and NILs of Melon Obtained from Two Consecutive Seasons (2008 and 2009)

parental line or NIL	pectic polysaccharides		hemicellulosic polysaccharides	
	ISF + CSF (%) ^a	$\Sigma P + \Sigma H$ (%) ^b	K1SF + K4SF (%) ^a	$\Sigma P + \Sigma H$ (%) ^b
Season 2008				
PS	13.8	44.0	17.6	56.0
SC	5.1	54.3	4.3	45.7
SC3-5-1	10.8	40.4	16.0	59.6
SC7-2	9.3	40.5	13.7	59.5
Season 2009				
PS	7.0	45.4	8.4	54.6
SC	9.8	57.7	7.2	42.4
SC3-5-1	7.4	39.2	11.4	60.8
SC7-2	5.4	39.2	8.4	60.9

^aRelative percentage of the total fractions quantified from cell wall material (ISF, CSF, K1SF, K4SF, and α CEL). ^bRelative percentage of the noncellulosic fractions quantified from cell wall material.

Table 5. Relative Percentage of Polysaccharides (%) in Imidazole Soluble Fraction (ISF), Carbonate Soluble Fraction (CSF), 1 M Potassium Soluble Fraction (K1SF) and 4 M Potassium Soluble Fraction (K4SF) of the Noncellulosic Polysaccharides Extracted from Cell Wall Material in the Parental Lines and NILs of Melon Obtained in Two Consecutive Seasons (2008 and 2009)

parental line or NIL	pectic polysaccharides		hemicellulosic polysaccharides	
	ISF (%)	CSF (%)	K1SF (%)	K4SF (%)
Season 2008				
PS	32.3	11.7	22.4	33.6
SC	41.0	13.2	23.7	22.1
SC3-5-1	19.0	21.4	26.5	33.1
SC7-2	21.1	19.4	23.9	35.6
Season 2009				
PS	24.3	21.1	31.0	23.6
SC	25.0	32.7	24.3	18.0
SC3-5-1	27.9	11.3	41.3	19.5
SC7-2	30.5	8.6	30.6	30.3

hemicellulosic fractions (especially in K4SF) than in the pectic fractions (44–55% in ISF and 55–81% in CSF) (Figures 1, 3, 4 and 6).

In K1SF, uronic acids were still the main component but to a lesser extent in SC (in 2008). Xylose was the most abundant neutral sugar in both parentals. PS showed lower Gal (14–34%)

and Man (13–48%) values and a very low Ara content compared with SC (81–172% higher in SC than PS). Rha content was lower in PS than SC only in 2009 (Figure 4). The peak below 6 kDa present in SC was absent from PS, and this parental had a group of intermediate molecular weight polysaccharides (110 to 70 kDa) absent from SC (Figure 5). In K4SF, Glc, UA, Xyl and Gal were the main components, with no differences between parentals, while Rha and Man had a lower and higher content in PS than in SC, respectively. Fucose was present in substantial percentages (in some samples higher than 5% of CWM in K4SF) (Figure 6). The main peak ranged between 70 and 110 kDa in both parentals. In PS this peak was wider than in SC and broadened due to a higher molecular weight. PS had more polysaccharides between 6 and 40 kDa with a higher peak close to 6 kDa than SC (Figure 7).

Cellulosic Fraction and Parental Lines. No differences between parentals were found as regards the predominance of the α CEL fraction in the cell wall structure (77–87% overall). In this fraction, cellulose was the major component (>86%). Galactose, glucose and uronic acids were the main noncellulosic components, indicating the presence of xyloglucans. PS showed more Gal (around 24%) and Man (52–66%) and less Ara (38–104%) and Glc (around 25%) than SC. Both parentals had significant percentages of Rha (>7%) (Figure 8).

Table 4 presents a summary of the soluble fractions (pectic and hemicellulose) and showed the differences between parental lines. The pectic fraction was defined as the sum of ISF and CSF, and the hemicellulosic fraction as K1SF plus K4SF. The percentages of pectic and hemicellulosic fractions were around 44% and 55%, respectively, for PS; while the same fractions for SC were around 56% and 44%, respectively. Therefore, PS showed a higher hemicellulosic fraction and a lower pectic fraction than SC. The ISF showed a higher content of low molecular weight polysaccharides in SC than PS (Figure 2).

Fruit Quality Traits of the Climacteric NIL SC3-5-1 versus PS. **Cell Wall Material and Fractions.** SC3 5 1 showed lower flesh firmness than PS in 2008 but not in 2009. The juice of SC3 5 1 had a higher soluble solid content and similar flesh juiciness and pellet content of the juice than PS. The hardness of SC3 5 1 was 50–65% lower than that of PS (Table 1). At harvest, the respiration rate and ethylene production were significantly higher in the climacteric NIL SC3 5 1 than in PS (data not shown).

In SC3 5 1, α CEL (77%), was the main component of the cell wall structure, in agreement with its inbred parentals. Overall, SC3 5 1 had 9–16% lower uronic acids content than PS (Table 2).

After cell wall fractionation, study of the ISF showed that the pectic sugars (UA, Gal and Ara) were present in SC3 5 1, as they were in PS. The imidazole soluble fraction from the climacteric NIL had a noticeably higher content of nonpectic sugars (especially in 2008) than PS. Glucose and fucose were 23–77% and 42–121% higher in SC3 5 1 than PS, respectively. In the season 2008, Man and Xyl values were higher (111% and 75% respectively) in SC3 5 1 than PS (Figure 1). By HPSEC (Figure 2), it was seen that the climacteric NIL showed more peaks in the ISF of high and low molecular weight than PS. The main peak of SC3 5 1 at 70 kDa was wider than the same peak in PS and showed a broadening of the eluted peak to a higher molecular weight. High MW polysaccharides (250 kDa) were detected in SC3 5 1 and were more abundant than in PS. Homogalacturonans were the main component in carbonate soluble fraction of SC3 5 1, as in PS (Figure 3).

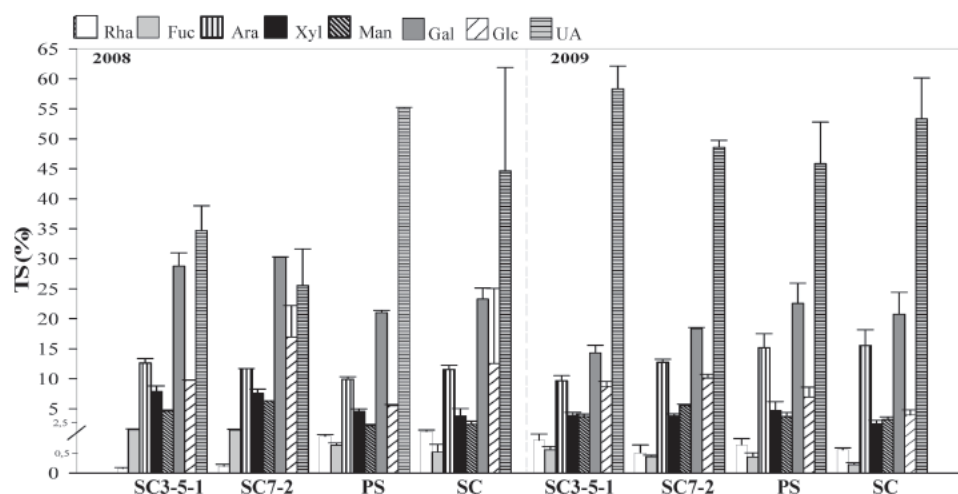


Figure 1. Composition of neutral sugars (NS) and uronic acids (UA) in the pectic imidazole soluble fraction (ISF) of the fruit flesh of different melon lines harvested in two consecutive seasons, 2008 and 2009. NS and UA are expressed in percentage of total sugar (TS) recovered from this fraction. Error bars with standard deviation (σ) are included in columns.

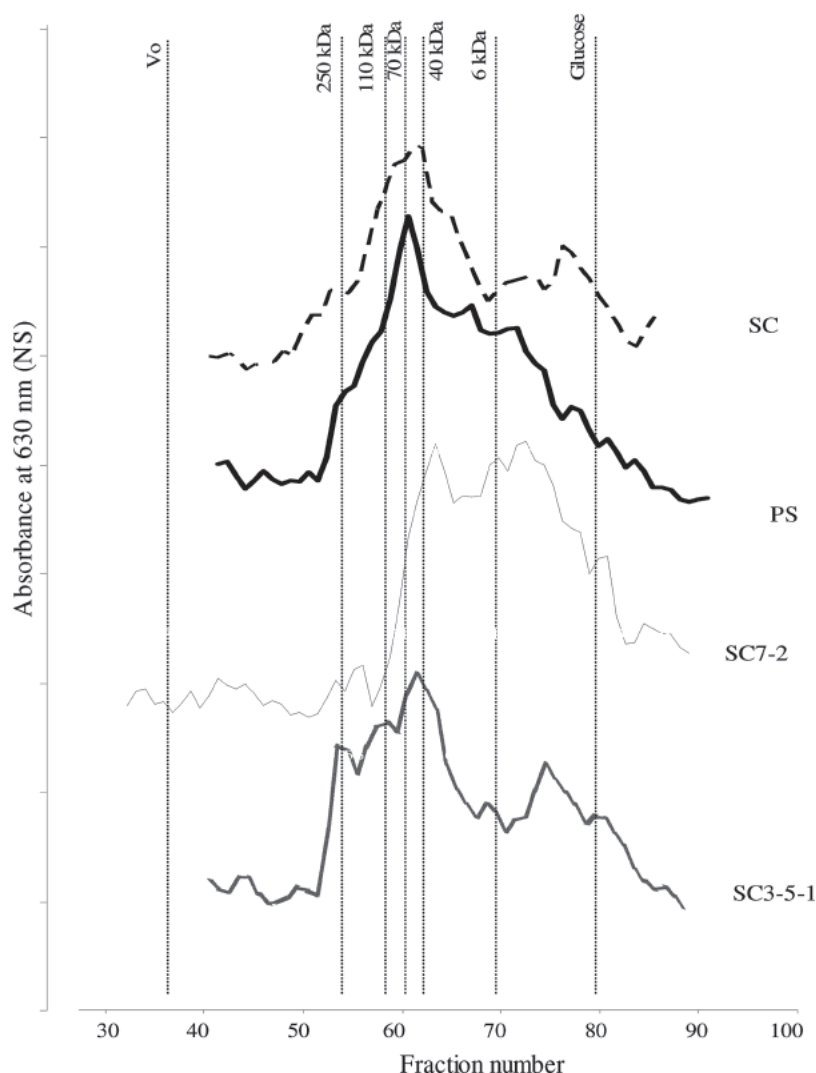


Figure 2. Molecular mass distribution of the neutral fraction from the pectic imidazole soluble fraction (ISF) of the fruit flesh of different melon lines. T250, T110, T70, T40, T6 and glucose were the molecular size standards, and V0 was the void volume.

In the K1SF hemicellulosic fraction, uronic acids and xylose were the main sugars in PS and in SC3 5 1, but this climacteric

NIL showed around 39% lower values in Ara than in PS (Figure 4). In HPSEC (Figure 5), SC3 5 1 did not show the

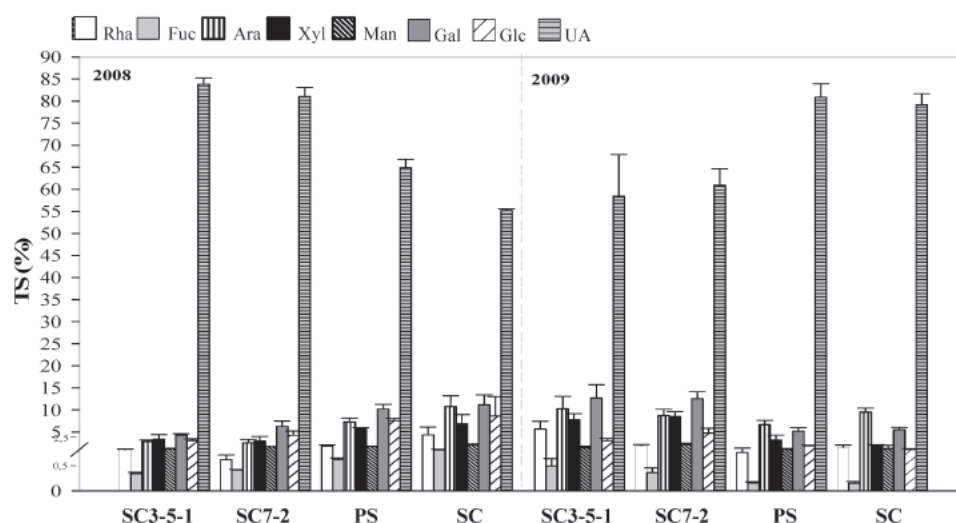


Figure 3. Composition of neutral sugars (NS) and uronic acids (UA) in the pectic carbonate soluble fraction (CSF) of the fruit flesh of different melon lines harvested in two consecutive seasons, 2008 and 2009. NS and UA are expressed in percentage of total sugar (TS) recovered from this fraction. Error bars with standard deviation (σ) are included in columns.

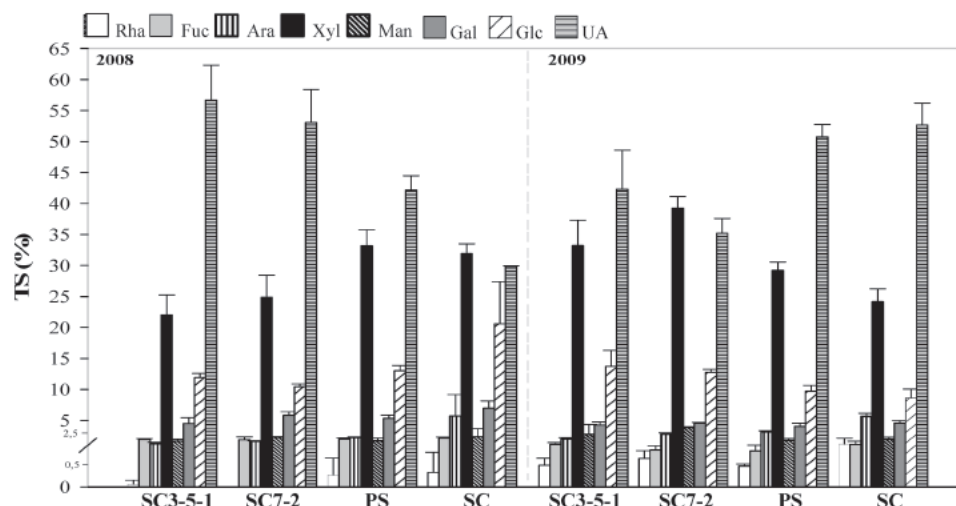


Figure 4. Composition of neutral sugars (NS) and uronic acids (UA) in the hemicellulosic 1 M potassium soluble fraction (K1SF) of the fruit flesh of different melon lines harvested in two consecutive seasons, 2008 and 2009. NS and UA are expressed in percentage of total sugar (TS) recovered from this fraction. Error bars with standard deviation (σ) are included in columns.

peak at 70 kDa present in PS, although other polysaccharides seemed to be similar. In the K4SF, the high values of glucose, xylose, galactose and fucose suggested the presence of xyloglucans in SC3 5 1, as in PS (Figure 6). SC3 5 1 had less Glc (7–46%), Rha (63–77%) and Fuc (38%) and more UA (23–50%) than PS (higher values in 2009). After HPSEC analysis (Figure 7), SC3 5 1 showed a principal polysaccharide peak close to 40 kDa, which shifted toward 70 kDa in PS.

In the α cellulose residue of SC3 5 1, CEL was the major component and Gal, Glc and UA were abundant, as in PS. SC3 5 1 had more Ara and less Man (especially in 2009), Fuc and Xyl than PS (Figure 8).

The pectic and hemicellulosic fractions of SC3 5 1 were 11% lower and 9% higher respectively, compared with PS. The main difference was in the hemicellulosic fractions of SC3 5 1 contain ing around 27% more K1SF than PS (Table 5).

The climacteric NIL SC3 5 1 showed the highest values in galac tose in the CSF, K4SF, and especially in α CEL (Figures 3, 6 and 8).

Fruit Quality Traits of the Nonclimacteric NIL SC7-2 versus PS. Cell Wall Material and Fractions. The trends in respiration rate and ethylene production were similar in the nondimacteric NIL SC7 2 and PS (data not shown). SC7 2 had 60% higher flesh firmness, 15–30% lower hardness and lower flesh juiciness (particularly in 2009) but a similar soluble solid content to PS (average value 10.7 °Brix) (Table 1).

Overall, SC7 2 had more neutral sugars, uronic acids and cellulose than PS (Table 2). Neutral sugars Gal, Rha, Man, Xyl and Fuc were higher in SC7 2 than PS (Table 3), differences that were more pronounced in 2009.

In the ISF, the flesh of SC7 2 had higher levels of hemicellulosic sugars Glc and Man than PS (Figure 1). In SC7 2, the main peak (present at 70 kDa in PS) shifted to a molecular weight below 40 kDa, and polysaccharides of low MW were more abundant than in PS (Figure 2). In the CSF, homogalacturonans were present in both, SC7 2 and PS (Figure 3).

In the K1SF, uronic acids and xylose were the main components in SC7 2, as in PS, and xylans were the main hemicellulosic polysaccharides. SC7 2 had less Ara and Fuc but slightly higher Man levels than PS (Figure 4). In HPSEC analysis, SC7 2 did not show the peak at 70 kDa present in PS (Figure 5). In PS, the main

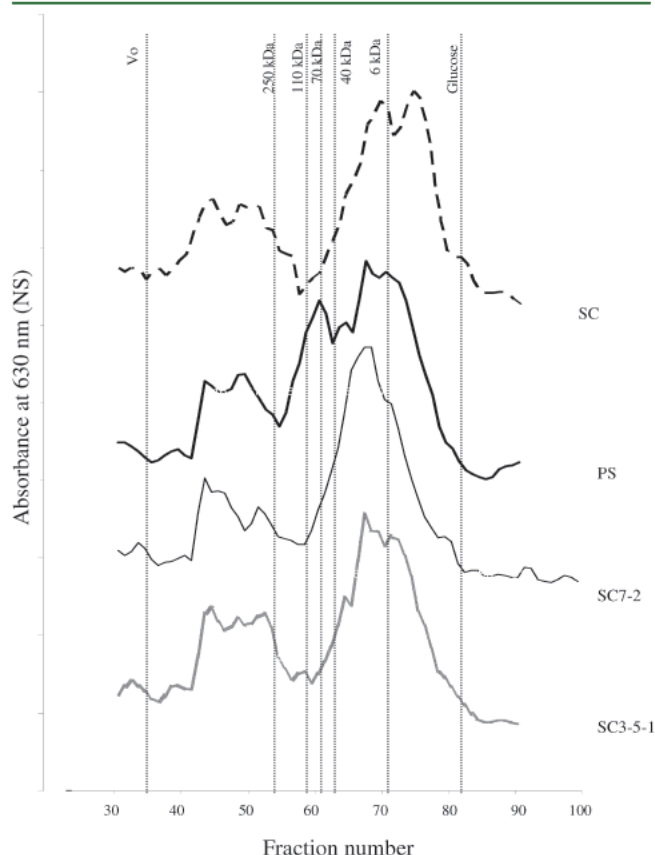


Figure 5. Molecular mass distribution of neutral fraction from the hemicellulosic 1 M potassium soluble fraction (K1SF) of the fruit flesh of different melon lines. T250, T110, T70, T40, T6 and glucose were the molecular size standards, and V0 was the void volume.

peak could be formed by the overlapping of two others, one of molecular weight between 40 and 6 kDa and another of around 6 kDa. However, in SC7 2 this second peak below 6 kDa was reduced to a small shoulder, so that the main peak was visible between 40 and 6 kDa. In the K4SF, uronic acids, glucose, xylose and galactose were the main components, so that xyloglucans were probably the most abundant polysaccharides, as in PS (Figure 6). The NIL SC7 2 had a main peak close to 110 kDa with a shift toward lower molecular weight (110 to 70 kDa) in PS, as indicated by HPSEC analysis (Figure 7).

Cellulose was the major constituent in α CEL of SC7 2, and noncellulosic sugars Gal, Glc and UA were the main components, as in PS. SC7 2 showed more Gal (24–58%), and less Man (around 25%) and UA (18%) than PS (Figure 8).

Compared with PS the cell wall structure of SC7 2 had a slightly higher α CEL content (>7%, data not shown) and less pectin and more hemicellulose (Table 4). The greatest differences were the higher values in the K4SF (Table 5), unlike in SC3 5 1, where K1SF was the main hemicellulosic fraction.

Differences between Seasons. The fruit from season 2008 grew outside their optimum summer conditions and attained a lower maturity index at harvest, with lower levels of soluble solids and free sugars. Uronic acids, cellulose and flesh firmness were higher in 2008 than in 2009 (Tables 1 and 2). As shown, both NILs showed a higher content of nonpectic sugars and lower content of UA in ISF of 2008 than 2009 (Figure 1) and in CSF of 2009 than 2008 (Figure 3).

The glucose/galactose ratio was less than 1 in 2008 and more than 1 in 2009 (Table 3). In 2009, the higher values of Gal and Rha in SC3 5 1 (Figure 3) would have contributed to the higher content of rhamnogalacturonans than observed in PS.

SC fruits harvested in 2009 only attained 5.3 °Brix and 3.8 g/100 g of free sugars (55.4 and 41.4% lower than PS, respectively). The pectic components (UA, Gal and Rha) and hemicellulosic components (Glc, Xyl and Man) were higher and lower in 2008 than in 2009, respectively (Table 3).

DISCUSSION

The locations and structures of cell wall polysaccharides are related to several texture parameters such as flesh firmness and

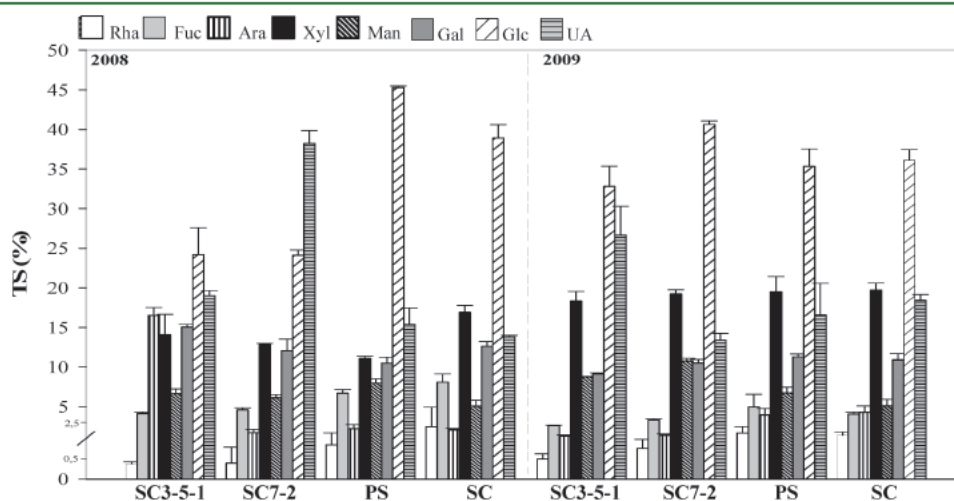


Figure 6. Composition of neutral sugars (NS) and uronic acids (UA) in the hemicellulosic 4 M potassium soluble fraction (K4SF) of the fruit flesh of different melon lines harvested in two consecutive seasons, 2008 and 2009. NS and UA are expressed in percentage of total sugar (TS) recovered from this fraction. Error bars with standard deviation (σ) are included in columns.

whole fruit hardness (Table 1). In general, the main changes that occur during fruit ripening, including softening, have been associated with modifications in the cell wall pectic structure. However, investigations have revealed that the hemicellulosic matrix of the cell wall is at least as important as the pectin matrix in determining the structural integrity of the wall.^{32,33} From the results of the present work, it can be proposed that no individual

polysaccharide group was fully responsible for the value of fruit texture in any of the melons lines analyzed, but the relative amounts of each group were important for texture.

Parental Lines (PS and SC). This is the first study that demonstrates that parental melons PS and SC showed marked differences in the intrinsic characteristics and composition of the cell wall structure irrespective of the other quality traits studied (Tables 1 and 2) and according to previous studies conducted for QTL mapping of quality traits.^{18,22} In general, PS had higher cell wall material yield, total uronic acids, neutral sugars and cellulose content and higher molecular weight, in the hemicellulose fractions than SC. These values, together with the different percentages of pectic and hemicellulosic components, contributed to the differences with PS, but did not explain why SC had similar flesh firmness to PS. The variability in firmness, texture and juiciness characteristic of ripe fruit of different types is in relation with differences in cell wall composition and marked diversity exists in cell wall changes between species and even different cultivars of the same species.³⁴ However, this information particularized on melons is lacking.

Pectic fractions of parental lines (and NILs) showed a typical melon composition found in several cultivars,^{5,7} with high content in UA, Gal and Ara. In parentals (and NILs), values of the typically hemicellulosic sugars (Xyl, Glc, Fuc and Man) pointed to depolymerization of these polysaccharides, whose fragments were collected in this fraction such as in other previous studies on "Prince" and "Wasada Uri" melons.⁸ The presence of hemicellulosic sugars in SC could be related to the presence of polysaccharides of low molecular weight (<6 kDa) indicating the onset of increased hydrolytic activity in this parental because depolymerization of hemicelluloses has been observed throughout ripening in "Charentais" melons.⁵

In the carbonate soluble fraction, homogalacturonans were the most abundant polysaccharide constituents in parental and NILs, accompanied by lower levels of rhamnogalacturonans and arabinogalactans in parentals. The solubilization problem of this fraction was present in the parentals and NILs analyzed. In CSF in green bean pods, solubilization problems have been reported previously² and suggest a low degree of esterification of the pectin extracted.

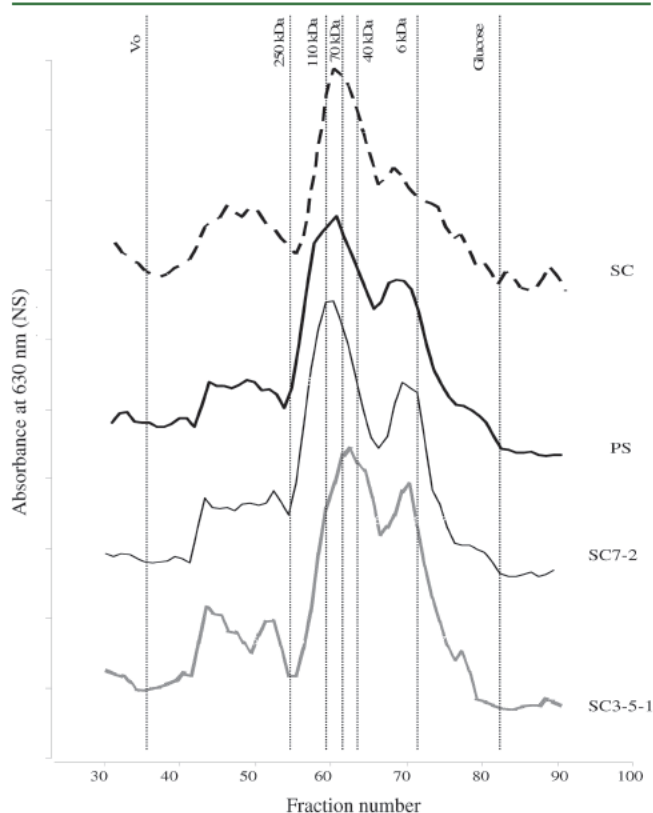


Figure 7. Molecular mass distribution of neutral fraction from the hemicellulosic 4 M potassium soluble fraction (K4SF) of the fruit flesh of different melon lines. T250, T110, T70, T40, T6 and glucose were the molecular size standards, and V0 was the void volume.

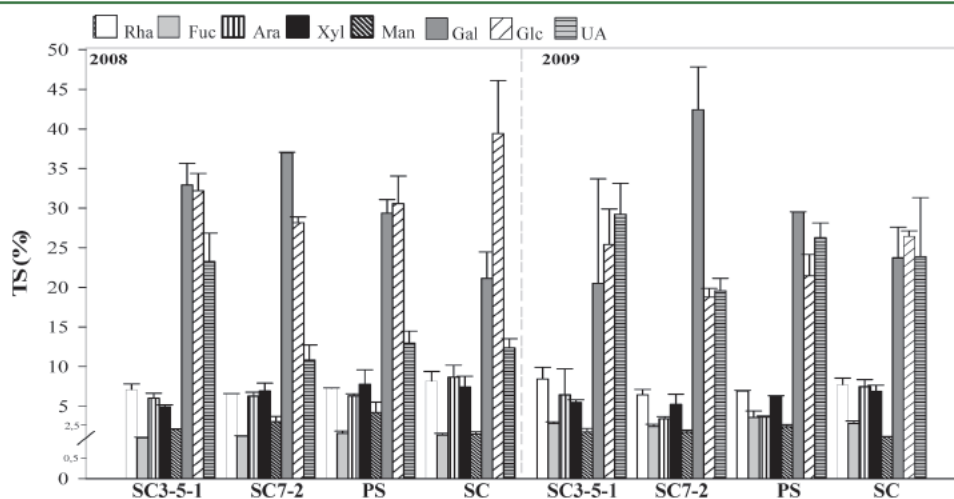


Figure 8. Composition of neutral sugars (NS) and uronic acids (UA) in α cellulose residue (α CEL) of the fruit flesh of different melon lines harvested in two consecutive seasons, 2008 and 2009. NS and UA are expressed in percentage on total noncellulosic sugar (TS) recovered from this fraction. Error bars with standard deviation (σ) are included in columns.

In hemicellulosic fractions, lower values of uronic acids than in pectic fractions were in agreement with results already reported in melon.⁵ However, in K1SF, xylose values suggested that xylans are the main polysaccharides, although the high content of uronic acids also quantified in this fraction indicated that significant amounts of pectins were still bound to the wall (in parental and NILs). The xylans are hemicellulosic components present in small quantities in the primary and secondary cell walls of dicotyledonous plants such as melon.¹⁰

Differences in texture between parentals could be explained in part by the intermediate molecular weight polysaccharides of K1SF present in PS, which could contribute to the increased firmness of this parental.

Xyloglucans could be the main component of K4SF of both parentals (and NILs) as indicated the values of Glc, Xyl and Fuc (Figure 6). These results are consistent with observations made for the monosaccharide composition of the hemicellulosic fraction of other cultivars such as Galia melons with their high levels of glucose, xylose and galactose.³⁵

α Cellulose residue was the main component in parentals (and NILs), which agrees with the results reported for Galia melon.³⁵ Cellulose and xyloglucans presents in α CEL contributed to texture values through their interactions.³⁶ Rhamnose values indicate that rhamnogalacturonans of low degree of branching were bound to cellulose microfibrils, probably due to rhamnogalacturonan/galactan type structure associations, as reported in papaya fruit.³⁷

Cellulose and hemicellulose exhibit a distinctive network of microfibrils via hydrogen bonds, which enhance cell wall rigidity and resistance to tearing. Pectin and hemicellulose confer plasticity and the ability to stretch. In the middle lamella, pectin plays a primary role in intercellular adhesion.³² Therefore, the differences observed in the percentages of pectins and hemicelluloses found in parental cell walls could have an important effect on fruit texture. There is extensive evidence to support the contribution of the matrix of noncellulosic polymers in cell wall disassembly during normal fruit ripening; however, cellulose microfibrils, in most cases, are not significant contributors to disassembly.¹⁷

NILs (SC3-5-1 and SC7-2). The genetic nature of the climacteric NIL SC3 5 1, that can somehow separate some ripening events such as climacteric ripening (ethylene dependent) and part of the softening process (a partly ethylene independent and partly ethylene dependent process^{4,13}), could explain differences in the cell wall composition (especially UA) and the reason for SC3 5 1 showing similar flesh firmness values despite different ripening index values at harvest compared to PS. The action of ethylene would determine in part the lower values of uronic acids in SC3 5 1 than in PS, probably due to the extensive depolymerization of pectic components as a result of enhanced endopolygalacturonase activity. In fact, ethylene treated watermelon fruit with a reduced total UA content showed increased PG activity.³⁸

On the other hand, the expression of polygalacturonase genes, which act in cell wall degradation and the loss of cell membrane semipermeability during ripening, has components that are both dependent and independent of ethylene action.¹⁶ Juice pellet content, juice, density and flesh juiciness values in the climacteric line SC3 5 1 could also help explain this fact, since, according to several authors,^{9,12} tissue firmness is associated with several attributes, including those mentioned.

The higher content in nonpectic sugars in imidazole soluble fraction of SC3 5 1 than PS was possibly a result of different

ripening index. Also, the NS content from side chains of pectins was higher in SC3 5 1 than in PS. The presence of NS from pectins is a common indication of ripening in all fruit species including melons.^{7,9,39}

The climacteric behavior of SC3 5 1 was in agreement with previous results in other climacteric NILs versus PS.^{18,23} The climacteric behavior of SC3 5 1 could be responsible for the differences in the high molecular weight polysaccharides extracted and could be related to the higher content of hemicellulosic polysaccharides present in ISF. The greater loss of high MW polymers in SC3 5 1 than in PS could affect the structure of the wall and consequently textural values during the subsequent postharvest phase, but particularly juiciness.

In K4SF, the lower molecular weight of the main peak in SC3 5 1 could be correlated with the QTLs contained in the introgression of SC present in this NIL and other similar NILs.^{18,21,23}

Climacteric NIL SC3 5 1 had the highest values in galactose. The increase in Gal indicates an increased content of pectic galactan side chains.⁴⁰ Studies in muskmelon (*Cucumis melo* L.) and other fruits point to a decrease in the level of the Gal as a result of ripening.^{36,39} Indeed, galactose does not decrease in ripening impaired tomato such as Cnr tomato mutants unable to soften⁴¹ or transgenic tomatoes with suppressed β galactosidase/exogalactanase activity.

The existence of melon varieties with climacteric and non climacteric behavior make this species a suitable system for studying the genetic control of climacteric ripening. In a recent study with near isogenic lines of melon five quantitative trait loci were associated with flesh firmness.¹⁸ The QTL *eth3.5* involved in ethylene production and climacteric response was located in an introgression of approximately 50 cM in SC3 Sb.²¹ In this introgression, the *CmACSS* and *CmEIL4* genes belonging to ACC synthase (ACS) multigenic family involved in ethylene biosynthesis and signaling have been mapped.¹⁸ In the climacteric NIL SC3 Sb, a QTL (*ff3.5*) associated with lower firmness values than the control PS was identified, suggesting that these values might be due to *eth3.5*, a climacteric QTL located in the same introgression as *ff3.5*. In our investigation, lower values of the cell wall components than PS, especially uronic acids, were associated with QTL *eth3.5*. An expansin *CmEXP2* has been mapped in this interval.¹⁸ Expansin enzymes are influenced directly by ethylene and cooperate with endopolygalacturonases to disassemble the polymer networks of cell wall including the cleavage of the α 1,4 linkages between the galacturonic acid residues of homogalacturonans,¹⁷ thereby contributing to fruit softening, especially in the early stage of fruit softening.⁴² Although the function of expansin enzymes may not cause the hydrolysis of pectin, it may enhance polymer degradation by affecting PG activity.⁴³ In tomato fruit, underexpression of an expansin gene resulted in a moderate increment in firmness due to a lower degree of pectin depolymerization.⁴⁴

Flesh juiciness and firmness values of nonclimacteric NIL SC7 2 were lower and higher than those of PS, respectively. Flesh juiciness is considered a main feature in fruit texture, but melon fruit with firmer flesh is usually less juicy and few QTLs associated with juiciness have been mapped so far in melon.²² In fact, SC7 2 showed lower juice leakage than PS during storage in fresh cut format.¹⁹

Enhanced CEL and NS contents (as in SC7 2 versus PS melons) and a reduced UA content in raw and cooked squash (*Cucumis maxima*) fruit have been associated with higher firmness.³⁶ The opposite trend in the UA content found by the

authors³⁶ compared with that observed in SC7 2 suggests that reduced UA is a cultivar dependent effect associated with flesh firmness or that it is not so essential for flesh firmness. In fact, higher values of UA may be due to the better maintenance of cell wall integrity in the covalently bound pectin polymers of SC7 2. A higher content in galactose has been related with higher flesh firmness in several fruits,⁴¹ and a reduction in Gal levels has also been proposed as an index of progression of flesh softening in peach.⁴⁵

In SC7 2, the higher ISF content of nonpectic sugars (as in the climacteric NIL SC3 5 1) than in PS indicates that, irrespective of the differences between NILs in firmness or climacteric behavior, pectins that were more branched and less joined to the wall structure were more solubilized in NILs than in PS. Also, hemicellulosic components were more abundant especially in less mature and firmer fruits harvested in 2008, and this can be an indication of the involvement of hemicellulose disassembly in fruit softening.

Mannose is a nonpectic sugar especially important for cross linkages between xyloglucan polymers in hemicelluloses and cellulose microfibrils, and the higher Man content in the pectic fractions (ISF and CSF) can be associated with firmer SC7 2 melons, as previously reported by Nishizawa and Ito.⁸

Hemicellulose was higher in NILs than PS. In SC7 2, K4SF was the main hemicellulosic fraction and K1SF in SC3 5 1. This fact could be consistent with the texture values of both NILs (Table 1). According to several authors,^{5,40,46} K1SF is characterized by solubilizing glycans barely involved in the wall structure, and contained only small amounts of xyloglucans, whereas in K4SF glycans tightly bound to the wall structure are released by breaking hydrogen bonds and swelling without dissolution of the cellulose microfibrils. This indicates greater involvement of K4SF polysaccharides in the maintenance of the wall structure, and therefore, a higher percentage of this fraction could be related to a harder fruit texture.

The highest values of hemicellulose and α CEL in SC7 2 could be related to the 1.6 fold higher flesh firmness observed in this nonclimacteric NIL than in PS. The fruit flesh firmness QTL, *fh7.2*, was located in an introgression of approximately 27 cM from SC in linkage group VII, and resulted in a fruit hardness value 1.8 fold higher than the value found for PS.^{18,22} Previous analyses of the change in hardness of fresh fruit²⁰ and in the flesh firmness of fresh cut cubes of SC7 2 and PS during storage¹⁹ indicated that the value at harvest is critical and that SC7 2 is also firmer than PS. The QTL of SC7 2 is located in linkage group VII.²¹ The effect of this QTL on cell wall composition according to our results was a higher level of hemicellulosic and lower level of pectic components, and higher uronic acid, neutral sugar (especially galactose), mannose (only in pectic fractions), cellulose and α cellulose residue contents. A pectin methylesterase *CmPME2* has been mapped in linkage group VII.¹⁸ PME de-esterification of polyuronides removes the methyl groups from the C6 position of galacturonic acid residues of high molecular weight pectin during fruit ripening.^{37,46} A higher yield of galactose and uronic acids may be due to increased content of pectic galactan side chains, and, consequently, the greater interaction with cellulose microfibrils⁴⁰ was probably associated with decreased PME (EC 3.1.1.11). Pérez Almeida and Carpita³³ proposed that the galactose side chains on the wall would decrease the wall's porosity, blocking the access of hydrolases such as PME to the wall components and preventing the depolymerization of structural polysaccharides. In this context, a reduced

β galactosidase level would also limit pectin methylesterase activity although this mechanism is not clear.⁴⁵

As regards the structural integrity of the cell wall, is important to highlight the role of the matrix of hemicellulose.^{32,33} The highest values of hemicellulose in SC7 2 (Tables 4 and 5) can be related to slower ripening process. A large number of studies have demonstrated that the depolymerization of hemicelluloses in ripening fruits, including melon, is closely correlated with fruit softening.¹⁷ In melon, modifications of hemicelluloses occurred through all ripening stages, but only few changes in the molecular weight of these compounds during ripening have been described.⁵ The role of cellulosic fraction is important because cellulose microfibrils interact with xyloglucans through cross bridges, which contributes to maintaining and strengthening the network structure observed microscopically.³⁶

The presence of more hemicellulosic and cellulosic fractions and reduced flesh juiciness can compromise the edibility of melon fruit containing the QTL of SC7 2. The importance of the abundance of cellulosic polysaccharides and/or of the covalently bound pectin polymers in cell wall integrity together with the galactose and mannose content of different fractions agrees with previous results of experiment in long shelf life melons stored at 20 °C.⁸ The enhanced cellulose fractions in SC7 2 may extend shelf life of this NIL but could compromise the fruit's nutritional value.

In summary, the biochemical effect of the QTLs of the climacteric NIL SC3 5 1 was associated with extensive pectin degradation and, consequently, polyuronide degradation, with no always significant effect on flesh firmness at harvest. In the nonclimacteric NIL SC7 2, the effect of the QTL which resulted in higher values of flesh firmness was associated with higher levels of cell wall components (especially galactose) and α cellulose residue.

Differences between Seasons. The less advanced solubilization and depolymerization processes of the cell wall components in 2009 than in 2008 explained the differences in UA, CEL and flesh firmness values between seasons. Menezes et al.³⁵ reported higher values of UA in less mature fruits of Galia melon. The higher soluble solids and NS content measured in 2009 was associated with fruit attaining a higher ripening index in 2009 than in 2008 for environmental and crop management reasons. In 2009, SC fruits were harvested less mature because the plants suffered from *Fusarium* sp. in their roots. These differences provoked a different level of solubilization and depolymerization of pectic and hemicellulosic components that reflected fruit ripening.^{9,39,40}

Sucrose accumulation accompanies fruit development and ripening in sweet melons⁴⁷ and was clearly dependent on environmental conditions because fruit from season 2009 accumulated more sucrose in the flesh than those from 2008 (data not shown).

This research will serve as the basis for studies on the dynamic of changes in texture attributes (particularly softening) and cell wall degradation caused by physical and enzymatic processes during melon ripening, as affected by QTLs.

■ ASSOCIATED CONTENT

● **Supporting Information.** Supplementary Figure 1, preparation of cell wall material (CWM) from the fresh melon flesh. Supplementary Figure 2, preparation of polysaccharide fractions from the fresh melon flesh. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34 968 32 54 36. Fax: +34 968 32 54 33. E mail: juanp.fdez@upct.es.

Funding Sources

This work was funded by Fundación Séneca de la Región de Murcia (Grants 05676/PI/07 and 11784/PI/09). N.D. S. is grateful for the fellowship contract FPU (AP2006 01565) and two research activities also supported by the Spanish Ministry of Education (MEC).

ACKNOWLEDGMENT

We thank the CIFEAT Torre Pacheco team (Plácido Varó, Antonio Gutiérrez, María José García, Ricardo Gálvez and co workers) for crop management; Javier Obando, Laura Llanos, José M. Serrano, Mohammad Mahdi Jowkar, Yineth Piñeros, Paola Jiménez, Rocío Pérez Reverte, Burak Turan and Juan Antonio Martínez, for the technical assistance at harvest and in the laboratory; PROCOMEL S.L. for the supply of packing materials; Fitó Seeds, for the seeds of PS; and IRTA CRAG, for the seeds of NILs and SC. Thanks to the group of "Cell wall and functional components" of the Instituto de la Grasa CSIC for the use of facilities and their cooperation.

ABBREVIATIONS USED

Ara, L arabinose; α CEL, α cellulose residue; CEL, cellulose; CSF, carbonate soluble fraction; CWM, cell wall material; ff, flesh firmness QTL; fh, flesh hardness QTL; Fuc, D fucose; Gal, D galactose; Glc, D glucose; ISF, imidazole soluble fraction; K1SF, 1 M potassium soluble fraction; K4SF, 4 M potassium soluble fraction; Man, D mannose; NIL, near isogenic line; MW, molecular weight; NS, neutral sugars; PG, endopolygalacturonase; PME, pectin methylsterase; PS, "Piel de sapo"; QTL, quantitative trait loci; Rha, L rhamnose; SC, accession PI 161375 cultivar "Shongwan Charmi"; UA, uronic acids; Xyl, D xylose

REFERENCES

- (1) Vicente, A. R.; Ortugno, C.; Powell, A. L. T.; Greve, L. C.; Labavitch, J. M. Temporal sequence of cell wall disassembly events in developing fruits. 1. Analysis of raspberry (*Rubus idaeus*). *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4119–4124.
- (2) Stolle Smits, T.; Beekhuizen, J. G.; Kok, M. T. C.; Pijnenburg, M.; Recourt, K.; Jan Derksen, J.; Voragen, A. G. J. Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiol.* **1999**, *121*, 363–372.
- (3) Rodríguez, R.; Jaramillo, S.; Heredia, A.; Guillén, R.; Jiménez, A.; Fernández Bolaños, J. Mechanical properties of white and green asparagus: changes related to modifications of cell wall components. *J. Sci. Food Agric.* **2004**, *84*, 1478–1486.
- (4) Nishiyama, K.; Guis, M.; Rose, J. K. C.; Kubo, Y.; Bennett, K. A.; Wangjin, L.; Kato, K.; Ushijima, K.; Nakano, R.; Inab, A.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Pech, J. C.; Bennett, A. B. Ethylene regulation of fruit softening and cell disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.* **2007**, *58*, 1281–1290.
- (5) Rose, J. K. C.; Hadfield, K. A.; Labavitch, J. M.; Bennett, A. B. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 345–361.
- (6) Saladié, M.; Matas, A. J.; Isaacson, T.; Jenks, M. A.; Goodwin, S. M.; Niklas, K. J.; Xiaolin, R.; Labavitch, J. M.; Shackel, K. A.; Fernie, A. R.; Lytovchenko, A.; O'Neill, M. A.; Watkins, C. B.; Rose, J. K. C.

Reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* **2007**, *144*, 1012–1028.

(7) Simandjuntak, V.; Barrett, D. M.; Wrolstad, R. E. Cultivar and maturity effects on muskmelon (*Cucumis melo*) colour, texture and cell wall polysaccharide composition. *J. Sci. Food Agric.* **1996**, *71*, 282–290.

(8) Nishizawa, T.; Ito, A. Analysis of cell wall polysaccharides during storage of a local melon accession "Wasada uri" compared to the melon cultivar "Prince". *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* **2007**, *82*, 227–234.

(9) Prasanna, V.; Prabha, T. N.; Tharanathan, R. N. Fruit ripening phenomena an overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2007**, *47*, 1–11.

(10) Waldron, K. W.; Parker, M. L.; Smith, A. C. Plant cell walls and food quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, *2*, 101–119.

(11) Bennett, A. B. Disassembly in ripening fruit: a general model. *HortScience* **2002**, *37*, 447–449.

(12) Harker, F. R.; Johnston, W. L. Importance of texture in fruit and its interaction with flavour. In *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects*; Brückner, B., Wyllie, S. G., Eds.; Woodhead Pub. Ltd.: Cambridge, England, 2008; Vol. 7, pp 132–149.

(13) Flores, F.; Ben Amor, M.; Jones, B.; Pech, J. C.; Bouzayen, M.; Latché, A.; Romojaro, F. The use of ethylene suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiol. Plant.* **2001**, *113*, 128–133.

(14) Obando Ulloa, J. M.; Jowkar, M. M.; Moreno, E.; Sour, M. K.; Martínez, J. A.; Bueso, M. C.; Monforte, A. J.; Fernández Trujillo, J. P. Discrimination of climacteric and non climacteric fruit at harvest and at senescence stage by quality traits. *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 1743–1753.

(15) Nishizawa, T.; Okafuji, K.; Murayama, H. Storability and development of physiological disorder of netted melon "Life" fruit as influenced by storage conditions. *Acta Hortic.* **2009**, *837*, 147–154.

(16) Wakasa, Y.; Kudo, H.; Ishikawa, R.; Akada, S.; Senda, M.; Niizeki, M.; Harada, T. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long term storage potential. *Postharvest Biol. Technol.* **2006**, *39*, 193–198.

(17) Bennett, A. B.; Labavitch, J. M. Ethylene and ripening regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Sci.* **2008**, *175*, 130–136.

(18) Moreno, E.; Obando, J.; Dos Santos, N.; Fernández Trujillo, J. P.; Monforte, A. J.; García Mas, J. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theor. Appl. Genet.* **2008**, *116*, 589–602.

(19) Gomes, H.; Fundo, J.; Obando Ulloa, J. M.; Almeida, D. P. F.; Fernández Trujillo, J. P. The genetic background of quality and cell wall changes in fresh cut melons. *Acta Hortic.* **2010**, *877*, 1011–1018.

(20) Tijskens, L. M. M.; Dos Santos, N.; Jowkar, M. M.; Obando, J.; Moreno, E.; Schouten, R. E.; Monforte, A. J.; Fernández Trujillo, J. P. Postharvest fruit firmness behaviour of near isogenic lines of melon. *Postharvest Biol. Technol.* **2009**, *51*, 320–326.

(21) Eduardo, I.; Arús, P.; Monforte, A. J. Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI 161375. *Theor. Appl. Genet.* **2005**, *112*, 139–148.

(22) Obando, J.; Fernández Trujillo, J. P.; Martínez, J. A.; Alarcón, A. L.; Eduardo, I.; Arús, P.; Monforte, A. J. Identification of melon fruit quality quantitative trait loci using near isogenic lines. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2008**, *133*, 139–151.

(23) Fernández Trujillo, J. P.; Obando Ulloa, J. M.; Martínez, J. A.; Moreno, E.; García Mas, J.; Monforte, A. J. Climacteric and non climacteric behavior in melon fruit 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near isogenic lines. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *50*, 125–134.

(24) Selvendran, R. R. Analysis of cell wall material from plant tissues: extraction and purification. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1011–1017.

(25) Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Fernández Caro, I.; Guillén, R.; Fernández Bolaños, J.; Heredia, A. Olive fruit cell wall: olive fruit cell wall: degradation of pectic polysaccharides during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 409–415.

(26) Jiménez, A.; Rodríguez, R.; Fernández Caro, I.; Guillén, R.; Fernández Bolaños, J.; Heredia, A. Olive fruit cell wall: degradation of

cellulosic and hemicellulosic polysaccharides during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 2008–2013.

(27) Ruiters, J. M.; Burns, J. C. Characterization of trifluoroacetic acid hydrolyzed of subtropical forage grass cell walls. *J. Agric. Food Chem.* **1987**, *35*, 308–316.

(28) Englyst, H. N.; Cumming, J. H. Simplified method for the measurement of total nonstarch polysaccharides by gas chromatography of constituent sugars as alditol acetates. *Analyst* **1984**, *109*, 937–942.

(29) Dische, Z. Color reactions of carbohydrates. In *Methods in carbohydrate chemistry*; Whistler, R. L., Wolfrom, M. L., Eds.; Academic Press: New York, 1962; pp 477–512.

(30) Blumenkrantz, N.; Asboe Hansen, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.* **1973**, *54*, 484–489.

(31) Fernández Trujillo, J. P.; Obando, J.; Martínez, J. A.; Alarcón, A. L.; Eduardo, I.; Arús, P.; Monforte, A. J. Quality management of experiments with a collection of near isogenic lines of melon. In *Proc. Third Virtual Iberoamerican Congr. Laboratory Quality Mgt. III IBER OLAB*; Atienza, J., Rabasseda, J., Eds.; Madrid, Spain, 2005; pp 149–158.

(32) Van Buren, J. The chemistry of texture in fruits and vegetables. *J. Texture Stud.* **1979**, *10*, 1–23.

(33) Pérez Almeida, I.; Carpita, N. C. The β galactosidases and the dynamics of the cell wall. *Interciencia* **2006**, *31*, 476–483.

(34) Brummell, D. A. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* **2006**, *33*, 103–119.

(35) Menezes, J. B.; Chitarra, A. B.; Chitarra, M. I. F.; Bicalho, U. O. Modifications of the cell wall components in Galia melons during ripening. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1997**, *17*, 301–308.

(36) Ratnayake, R. M. S.; Melton, L. D.; Hurst, P. L. Influence of cultivar, cooking, and storage on cell wall polysaccharide composition of winter squash (*Cucurbita maxima*). *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *44*, 1904–1913.

(37) Manrique, G. D.; Lajolo, F. M. Cell wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest Biol. Technol.* **2004**, *33*, 11–26.

(38) Karakurt, Y.; Muramatsu, N.; Jeong, J.; Brandon, M.; Hurr, B. M.; Huber, D. J. Matrix glycan depolymerisation and xyloglucan endohydrolase activities in ethylene treated watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2008**, *88*, 684–689.

(39) Goulao, L. F.; Oliveira, M. C. Cell wall modifications during fruit ripening: when a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci. Technol.* **2008**, *19*, 4–25.

(40) Brummell, D. A.; Dal Cin, V.; Crisosto, C. H.; Labavitch, J. M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 2029–2039.

(41) Orfila, C.; Huisman, M. M. H.; Willats, W. G. T.; van Alebeek, G. J. W. M.; Schols, H. A.; Seymour, G. B.; Knox, P. J. Altered cell wall disassembly during ripening of *Cnr* tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta* **2002**, *215*, 440–447.

(42) Cantu, D.; Vicente, A. R.; Greve, L. C.; Dewey, F. M.; Bennett, A. B.; Labavitch, J. M.; Powell, A. L. T. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, *105*, 859–864.

(43) Xue, Z.; Kou, X.; Luo, Y.; Zhu, B.; Xu, W. Effect of ethylene on polygalacturonase, lipoxygenase and expansin in ripening of tomato fruits. *Trans. Tianjin Univ.* **2009**, *15*, 173–177.

(44) Jiménez Bermúdez, S.; Redondo Nevado, J.; Muñoz Blanco, J.; Caballero, J. L.; López Aranda, J. M.; Valpuesta, V.; Pliego Alfaro, F.; Quesada, M. A.; Mercado, J. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* **2002**, *128*, 751–759.

(45) Manganaris, G. A.; Vasilakakis, M.; Diamantidis, G.; Mignani, I. Diverse metabolism of cell wall components of melting and non melting peach genotypes during ripening after harvest or cold storage. *J. Sci. Food Agric.* **2006**, *86*, 243–250.

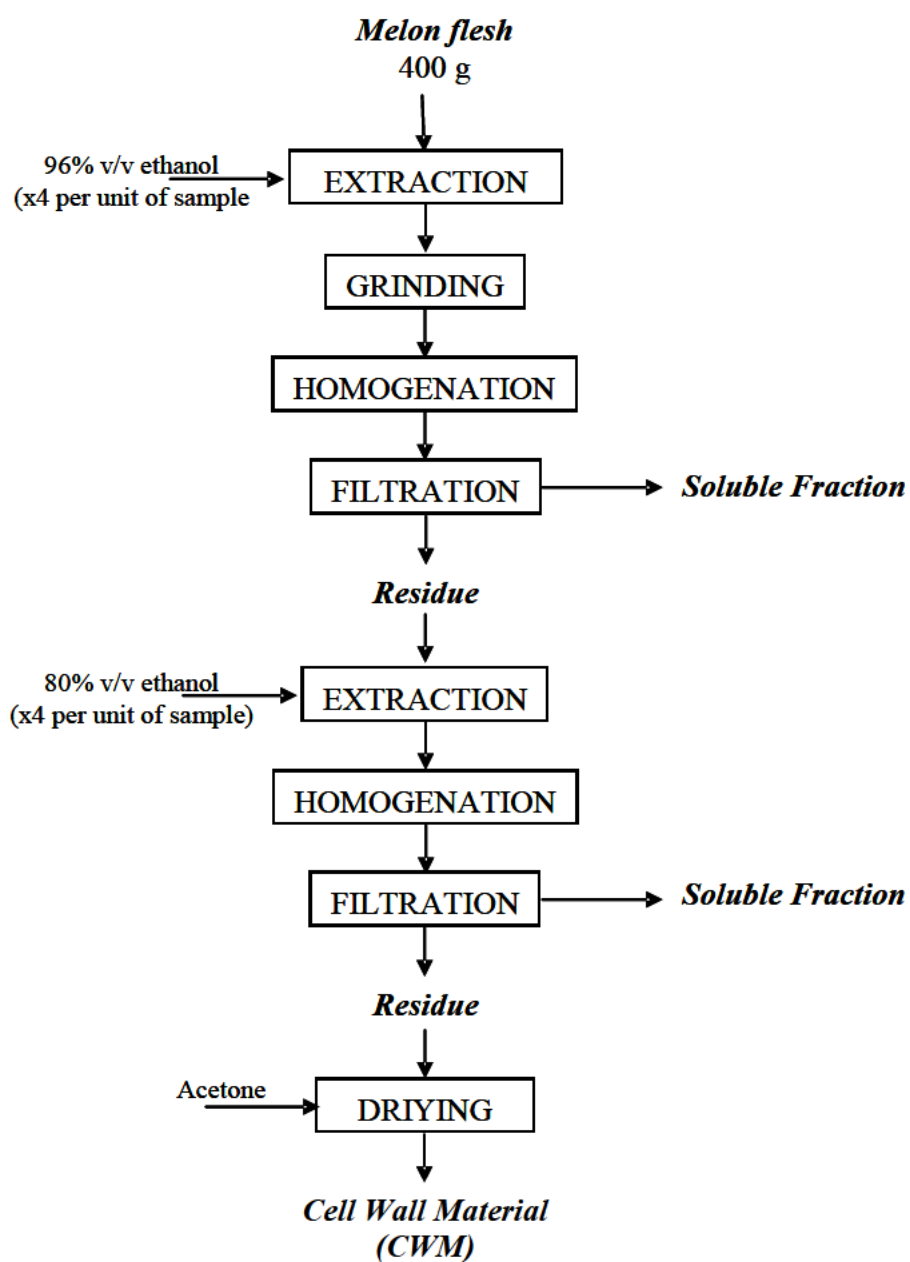
(46) Brummell, D. A.; Harpster, M. H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **2001**, *47*, 311–340.

(47) Villanueva, M. J.; Tenorio, M. D.; Esteban, M. A.; Mendoza, M. C. Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. *Food Chem.* **2004**, *87*, 179–185.

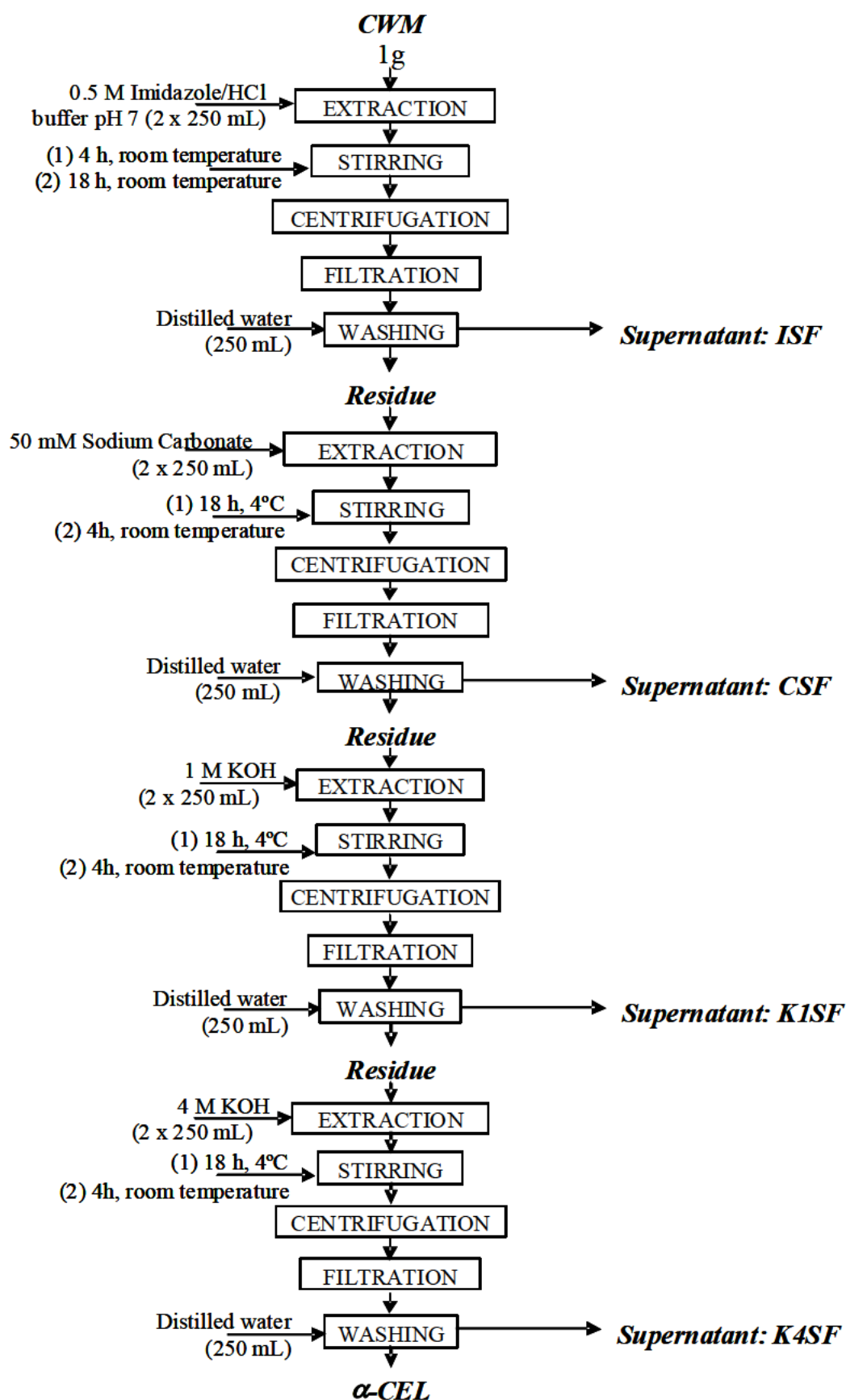
NOTE ADDED AFTER ASAP PUBLICATION

Figures 1, 3, 4, 6, and 8 have been revised after the original online publication of June 9, 2011. The corrected versions appear in the online version published June 30, 2011.

SUPPORTING INFORMATION



Supplementary Figure 1. Preparation of cell wall material (CWM) from the fresh melon flesh.



Supplementary Figure 2. Preparation of polysaccharide fractions from the fresh melon flesh.

CAPÍTULO V

AROMA VOLATILES AS BIOMARKERS OF TEXTURAL DIFFERENCES AT HARVEST IN NON-CLIMACTERIC NEAR-ISOGENIC LINES OF MELON



Aroma volatiles as biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon



Noelia Dos-Santos^{a,b}, María Carmen Bueso^c, Juan Pablo Fernández-Trujillo^{a,b,*}

^a Department of Agricultural & Food Engineering, Regional Campus of International Excellence "Campus Mare Nostrum" (CMN), Technical University of Cartagena (UPCT), Paseo Alfonso XIII, 48, ETSIA, E-30203 Cartagena, Murcia, Spain

^b Institute of Plant Biotechnology, CMN, UPCT, Plaza del Hospital s/n, Campus Muralla del Mar, E-30202 Cartagena, Murcia, Spain

^c Department of Applied Mathematics and Statistics, CMN, UPCT, Campus Muralla del Mar, Doctor Fleming s/n, ETSII, E-30202 Cartagena, Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 June 2013

Accepted 18 September 2013

Available online 27 September 2013

Keywords:

Aroma volatiles

Cucumis melo L.

Introgression lines

Multivariate statistical techniques

Quantitative trait loci

Texture

Flesh firmness

ABSTRACT

The texture and aroma volatiles of two non climacteric near isogenic lines (NILs) of melon (*Cucumis melo* L.), SC10 2 and SC7 1, containing introgressions of the Korean cultivar 'Shongwan Charmi' accession PI 161375(SC) in the Spanish cultivar 'Piel de Sapo' (PS) were studied. Data were examined using different supervised and unsupervised univariate and multivariate statistical techniques in order to determine the aroma volatiles most closely associated with differences in melon texture. SC10 2 showed 65% higher flesh firmness, a higher level of pellet juice content and lower flesh juiciness than PS and was harvested at least 7 days later. In SC7 1, only the textural trait, whole fruit hardness, was lower (by 34%) than in PS. About eleven quantitative trait loci for aroma volatiles were mapped in linkage group VII and other nineteen in group X. The aroma compounds discriminated SC10 2 from PS better than SC7 1, as revealed by Partial least squares discriminant analysis and, to a lesser extent, by Random forest analysis. Around seven aroma volatile compounds, mostly ketones, aldehydes and alcohols, consistently lent support to the discrimination irrespective of the methodology used. Higher levels of several aldehydes (e.g. 2,4 dimethylbenzaldehyde, 2 methylpropanal and 2 methylbutanal), not present in PS, discriminated SC10 2 from PS. Also, SC10 2 lacked some ketones (e.g. 1 phenylethanone), alcohols (e.g. 1 phenylethanol) and one acid (e.g. 2 phenylpropanoic acid) compared with higher content in PS. The former aldehydes and other compounds, such as 3 methylsulfanylpropanal, were the volatiles with the closest association with flesh firmness and harvest, and form part of the phenylalanine, leucine, valine, isoleucine or methionine metabolism and the benzenoid biosynthetic pathway. A negative correlation with the former discriminative compounds of SC7 1 and PS and whole fruit hardness was established. SC7 1 stood out mainly for its higher content of one sulfur derived compound (S methyl ethanethioate), one acetate ester (benzyl acetate) and two alcohols (octan 1 ol and (2R, 3S) 3 ethylheptan 2 ol) compared with PS, and one ketone (pentane 2,3 dione), which was absent in PS, but none of these were associated with flesh textural traits.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Melon fruit ripening is a genetically programmed event characterized by a series of physiological and biochemical changes that affect taste traits (sugars, organic acids, amino acids), fruit texture and aroma production,

among other quality traits, making the fruit more palatable to consumers (Ezura & Owino, 2008; Saffner & Lester, 2009; Vallone, Sivertsen, Anthon, Barrett, Mitcham, Ebeler, et al., 2013; Villanueva, Tenorio, Esteban, & Mendoza, 2004).

Melon aroma is determined by unique combinations of aroma active compounds, the proportions of key volatiles as well as the presence or absence of several unique components (Pang, Guo, Qin, Yao, Hu and Wu, 2012; Vallone et al., 2013). Aroma is strongly dependent on the cultivar and physiological behavior of the fruit (Obando Ulloa, Moreno, García Mas, Nicolai, Lammertyn, Monforte, et al., 2008). Volatiles derived from amino acids as precursors, particularly esters, are the major contributors to melon aroma (Gonda, Bar, Portnoy, Lev, Burger, Schaffer, et al., 2010).

Texture is one of the most important quality parameters and is partly responsible for consumer preferences of edible fruit (Harker & Johnston, 2008), while softening partly associated with cell wall polysaccharide changes is a determining factor in the quality and postharvest life of

Abbreviations: ANOVA, Analysis of variance; FDR, False discovery rate test; FF, flesh firmness; FJ, flesh juiciness; GC-MS, gas-chromatography mass-spectrometry; JD, juice density; JJ, juiciness; LG, linkage group; LRI Cal, calculated linear retention index; LRI, linear retention index; NID, unidentified compound; NILs, near-isogenic lines; NIST, National Institute for Standards and Technology; PJ, pellet content of the juice; PLS-DA, Partial least square-discriminant analysis; PS, Spanish cultivar 'Piel de Sapo'; RF, Random forest; SC, Korean cultivar 'Shongwan Charmi' accession PI161375; SPME, Solid phase micro-extraction; QTL, quantitative trait loci; VIM, Variable importance measures; VIP, Variable importance in the projection; WHF, whole fruit hardness.

* Corresponding author at: Department of Agricultural and Food Engineering, Technical University of Cartagena (UPCT), Campus Alfonso XIII, Paseo de Alfonso XIII, 48, ETSIA, E-30203 Cartagena, Murcia, Spain. Tel.: +34 968 32 54 36; fax: +34 968 32 57 32.

E-mail address: juanp.fdez@upct.es (J.P. Fernández-Trujillo).

fruit (Dos Santos, Jiménez Araujo, Rodríguez Arcos, & Fernández Trujillo, 2011). Harvesting firm and early mature fruits is a commercial practice commonly adopted to maximize post harvest life, but this practice can modify the fruit aroma profile, and is counterproductive to the flavor and quality, especially in climacteric fruit (Navarro, 1997; Vallone et al., 2013). Fruits with very soft flesh or that are over mature are also rejected by consumers (Abrahão, Miguel, Dias, Spoto, & da Silva, 2009), particularly for the fresh market, due to loss of volatiles during storage (Amaro et al., 2013).

Aroma biosynthesis and textural changes during fruit ripening and senescence have a certain correlation due to a matrix effect. The aromas trapped in the network formed by the polysaccharides modify flesh and juice viscosity (Bezman, Mayer, Takeoka, Buttery, Ben Olie, Rabinowitch, et al., 2003; Harker & Johnston, 2008; Savary, Guichard, Doublier, & Cayot, 2006). Matrix effect also can result in differential substrate supply due to differences in membrane peroxidation catalyzed by lipoxygenases (Harker & Johnston, 2008; Whitaker & Lester, 2006).

One near isogenic line (NIL) of melon (SC10 2) contains quantitative trait loci (QTL) with a positive effect on flesh firmness (Moreno, Obando, Dos Santos, Fernández Trujillo, Monforte and Garcia Mas, 2008) and also in juiciness retention in refrigerated fresh cut cubes of SC10 2 (Gomes, Fundo, Obando Ulloa, Almeida, & Fernández Trujillo, 2009). Also, the aroma profile and, to a lesser extent textural traits, are efficient tools for discriminating climacteric NILs from non climacteric ones (Obando Ulloa, Jowkar, Moreno, Souiri, Martínez, Bueso, et al., 2009; Obando Ulloa et al., 2008).

The goal of this work was to map QTLs and select the most discriminant flesh aroma volatiles as potential biomarkers of textural differences (especially flesh firmness) due to introgressions in melon chromosomes VII and X. The usefulness of combining univariate and multivariate statistical methods and aroma pathways potentially involved in textural differences between PS and NILs are also discussed.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The non climacteric melon near isogenic lines were obtained through repeated backcrossing between non climacteric parentals, the Spanish melon *Cucumis melo* L., Inodorus group, cultivar T111, of the 'Piel de Sapo' type (PS) and the exotic Korean accession PI 161375 (SC; *Cucumis melo* L. var. 'Shongwan Charmi' sp. *Agrestis*, Conomon group) (Eduardo, Arús, & Monforte, 2005; Moreno et al., 2008). Two non climacteric NILs (SC7 1 and SC10 2) with introgressions of SC in a single linkage group (LG) of the PS genetic background as mapped by Eduardo et al. (2005) were tested. The first numbers (7 or 10) refer to the LG containing the introgression (i.e. in the chromosomes VII and X, respectively) (Dos Santos et al., 2011; Tijskens, Dos Santos, Jowkar, Obando, Moreno, Schouten, et al., 2009). Fruit quality traits of both NILs were compared with those of the PS parental.

2.2. Experimental design

Melons were cultivated in Mediterranean conditions in Torre Pacheco (Murcia, Spain) according to the growing practices commonly used for this crop. The number of replicates was 21 for PS and 3 and 5 replicates, respectively, for NILs SC10 2 and SC7 1 (Fernández Trujillo, Obando, Martínez, Alarcón, Eduardo, Arús and Monforte, 2005; Obando, Fernández Trujillo, Martínez, Alarcón, Eduardo, Arús, et al., 2008; Tijskens et al., 2009).

2.3. Textural traits

Flesh juiciness (FJ), juice density (JD), juiciness (JJ) and pellet content of the juice (PJ) were measured according to the methodology described in Dos Santos et al. (2011) and Obando et al. (2008). The results

were expressed in grams of juice per kg fresh weight, grams of juice per mL juice, grams of juice per kg juice and grams of pellet per kg juice.

Whole fruit hardness (WFH) was determined at the equator as previously reported measuring the compression force to achieve 2 mm deformation (Tijskens et al., 2009). Flesh firmness (FF) was measured with a puncture test using cylinders (L = 20 mm; Ø = 15 mm) obtained with stainless steel apple corers from the equator of the fruit and a 4.6 mm wide probe (TG83, SAE Ibertest, Madrid, Spain) adapted to a testing machine (ELIB 5K, SAE Ibertest) (Fernández Trujillo et al., 2005).

2.4. Juice sampling and volatile compounds analysis

The methodology to determine the volatile aroma composition of melon juice by constant flow gas chromatography mass spectrometry (GC MS) was adapted from Obando Ulloa et al. (2008). The volatile compounds were measured from vials stored at -80°C with a solution containing melon juice and saturated calcium chloride. The previously tempered juice was poured into a 10 mL glass vial (Gerstel, Germany) and then an internal standard (10 µL of phenyl ethyl alcohol 0.01% v/v; Merck, Spain) dissolved in 1 mL deionized water (Type I) was added. We added this amount to each vial before analysis. The volatiles were analyzed by solid phase micro extraction (SPME) and identified by gas chromatography mass spectrometry, according to Obando Ulloa et al. (2008). Briefly, the 1 cm long SPME fiber was a 50/30 µm divinylbenzene/carboxen on polydimethylsiloxane coating (57329 U DVB/Carboxen™/PDMS Stable Flex™ Fiber, Supelco, Bellefonte, PA, USA). Fiber was automatically preconditioned before extraction in the injection port at 250°C for 1 h and remained for 30 min at 35°C absorbing the volatiles of the vial.

The analyses were conducted with a MPS2 Gerstel Multipurpose sampler coupled to the 6890 GC coupled to a mass spectrometer 5975 with a hyperbolic quadrupole (Agilent Technol.). The injection port was operated at 280°C in a splitless mode and subjected to a pressure of 80 psi. The liner was a 78.5 mm × 6.5 mm × 0.75 mm internal diameter (SPME/direct, Supelco). Volatiles were separated according to Obando Ulloa et al. (2008) on a 30 m × 0.25 mm id × 0.25 µm thickness capillary column (HP 5MS UI, Agilent Technol.). The inlet liner used was a 2637505 SPME/direct (Supelco), 78.5 mm × 6.5 mm × 0.75 mm. Chromatographic grade helium was used as the carrier gas with a flow rate of 1.5 mL/min. The variable temperature program was an initial oven temperature of 35°C , followed by a ramp of $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ up to 75°C , and then at $50^{\circ}\text{C}/\text{min}$ to reach a final temperature of 250°C , which was held for 5 min. Mass spectra were obtained by electron ionization (EI) at 70 eV, and a spectrum range of 40–450 m/z was used. The detector worked at 230°C and in full scan with data acquisition and ion mass captured between 30 and 300 amu. The total flow 54.4 mL/min.

The chromatograms and mass spectra were evaluated using the ChemStation software (G1791CA, Version C.00.00, Agilent Technol.). The compounds were tentatively identified by comparing their mass spectra with those included in the National Institute for Standards and Technology (NIST05a.L, search version 2.0) data bank and by comparing with linear retention indices (LRI) reported in the literature or NIST database (http://webbook.nist.gov/chemistry/cas_ser.html) (Obando Ulloa et al., 2008).

Volatiles were classified into ten classes of compounds (acetate esters, acids alcohols, aldehydes, alkanes, ketones, non acetate esters, sulfur derived compounds, others and terpenes) and all the areas of the compounds were added to the corresponding class and percentages were based on total area of the identified compounds.

For individual aroma volatile compounds, the area of each compound was normalized according to the internal standard and the results are reported as percent of normalized area of each compound divided by total area counts of the identified compounds. In a separate

analysis, normalized areas were also used. When data were not detected, empty cells were automatically considered as zero for the analysis.

Variables representing volatile compounds with a presence below 25% of the fruits and below 50% of the replicates analyzed in all melon lines were discarded. The volatile compounds such as silane and siloxane derivatives, or volatile organic compounds associated with contamination, plastic composition, and the fiber were discarded and are not reported here. Some compounds of importance obtained in the analysis were classified as unidentified (NID) and reported according to their mass spectra.

2.5. Statistical analysis and QTL mapping

All individual volatile compounds for each melon line were subjected to exploratory data analysis to detect possible outliers by using box whisker plot graphs and also normal probability plots to detect potential deviations from normality. If necessary, the Box-Cox family of transformations was used to estimate normalizing transformations of each univariate variable. This transformation was made to obtain residuals from the analysis of variance (ANOVA) as close to normal distribution as possible (Box & Cox, 1964). In order to apply this type of transformation in cases with zero values in the input data, a constant is added to all the observed data.

A one-way ANOVA with pedigree (PS, SC10-2 or SC7-1) as factor was conducted. We also applied the false discovery rate (FDR) test (Benjamini & Hochberg, 1995) to correct the raw P values for the multiple test. When pedigree was significant at $P \leq 0.05$, QTL mapping was conducted according to Obando et al. (2008) by establishing significant differences between PS and each NIL according to a Dunnett's test at $P = 0.05$. The QTLs were mapped in the LG region previously flanked by molecular markers (Eduardo et al., 2005).

In order to apply different multivariate statistical analysis to the individual aroma volatile variables, the zero values were substituted by the minimum non-zero value observed in the whole dataset and log transformation (base 2) was performed (Mathieu, Dal Cin, Fei, Li, Bliss, Taylor, et al., 2009). The data were mean centered and scaled to unit variance to avoid the effect of the scale of the measurements on the variables. Principal components analysis (PCA) was used for a descriptive analysis in order to determine the structure of the data and to detect potential outlier data. The results reported in this paper are based on other multivariate techniques and classification methods such as Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) and Random forest (RF). These classification methods are well established approaches to handle high dimensional datasets and provide variables important measures for determining the contribution of the aroma volatile compounds in the classification.

All statistical analyses were conducted using the R free software environment version 2.14.1 (2011-12-22) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) and the *FactoMineR* (Husson, Josse, Le, & Mazet, 2012), *caret* (Kuhn, 2013) and *randomForest* (Liaw & Wiener, 2002) packages for PCA, PLS-DA and RF, respectively.

PLS-DA is a PLS regression method where the response variable is a categorical variable and the number of components to be extracted is usually set to $k=1$, where k is the number of levels of the factor. In this case, the different levels of the response variable are the different melon cultivars or NILs and the vector of explanatory variables are the aroma volatiles (Obando Ulloa et al., 2008). The set of PLS components are a linear combination of the original explanatory variables (aroma volatiles) whose coefficients are defined maximizing at the same time the description of the variability of the explanatory variables and the prediction of the response variable (Gabrielsson & Trygg, 2006; Karp, Griffin, & Lilley, 2005). The multidimensional data structure was visualized by constructing score plots and correlation loading plots. The centroids represented in the bidimensional space of the two PLS components in the score plots are the average value of all the observations within each NIL and were used for an easier interpretation of the figure. The ellipses

around each centroid were drawn at 65% confidence level with the *car* package in R language. The correlation loading plot of the PLS-DA indicates the correlation between the original variables (aroma volatiles) and the PLS components. The coordinates of an aroma volatile on the first and the second latent variables show how well these volatiles are correlated with the latent variables. The concentric circles on the figures represent 25%, 50% and 100% explained variance of the aroma volatiles by the latent variables.

Additionally, we have included in this plot the correlations between the textural traits and the latent variables. We also have computed the Pearson correlations between textural traits and volatile compounds to measure the linear dependence between them.

For PLS-DA, a total of two components and four criteria to measure the influence of the aroma volatile compounds on the classification were considered. The first criterion of the PLS-DA selected the most discriminant aroma volatiles variables between the two outer circles (more than 50% of its variability is explained by the first two latent variables, i.e., distance from the origin greater than 0.7). These variables are important in describing the variability within the dataset (Obando Ulloa et al., 2008). The second criterion for this multivariate analysis was Variable importance in the projection (VIP) scores higher than a given threshold. As a selection criterion, a cut-off value greater than one it is generally used for the variables. The third criterion, Variable importance measures (VIM), was computed based on weighted sums of the absolute regression coefficients, where the weights are a function of the reduction of the sums of squares across the number of PLS components. For both VIP and VIM criteria, the selection of the number of discriminant volatile compounds was based on the change of the slope of the VIP or VIM values, respectively. Finally, the fourth criterion consists of selecting the main compounds showing higher absolute loading weights of one of the two PLS-DA components (Quintás, Portillo, García Cañaveras, Castell, Ferrer and Lahoz, 2012).

RF is a classification method based on a collection of decision trees using samples from the dataset applicable to a large number of input variables. The RF analysis provided two variable importance measures useful for quantifying the relative contribution of each variable to the classification (Liaw & Wiener, 2002). The first (RF1) was based on mean decreases in accuracy and the second (RF2) was based on the mean decreases in the Gini index. Multidimensional scaling (MDS) plots were used to visualize the RF dissimilarity graphically. As mentioned above, the selection criteria to conduct screening compounds listed by RF were also a change in the slope of mean decreases in accuracy and mean decreases in the Gini index.

3. Results

3.1. Physiological behavior, textural traits and selection of aroma volatile compounds

Both NILs and PS showed non-climacteric behavior accompanied by ethylene production levels below $5 \text{ pmol}/(\text{kg} \cdot \text{s})$ of ethylene. SC10-2 showed an average of $225 \text{ nmol}/(\text{kg} \cdot \text{s})$ of CO_2 while levels of PS or SC7-1 were 360 or $410 \text{ nmol}/(\text{kg} \cdot \text{s})$ of CO_2 , respectively (data not shown).

SC10-2 had higher flesh firmness (11.2 N) than PS (6.8 N) but similar whole fruit hardness (58.2 N/mm). SC7-1 had lower whole fruit hardness (36.9 N/mm) than PS (56.9 N/mm), but similar flesh firmness (7.1 N). PS and both NILs showed similar flesh juiciness ($\bar{x} = 366.9 \text{ g/kg}$) and juice density ($\bar{x} = 1015 \text{ kg/m}^3$) values. The pellet content of the juice ($\bar{x} = 65.5 \text{ g/kg}$) and juiciness ($\bar{x} = 934.5 \text{ g/kg}$) were similar in PS and SC7-1. SC10-2 showed a higher pellet content of the juice (72.9 g/kg) and lower juiciness (927.1 g/kg) than PS (64.1 and 936.0 g/kg). These flesh and juice textural differences detected between PS and SC10-2 served as a basis for mapping four textural QTLs (*fh7.1*; *ff10.2*; *pc10.2*; *fj10.2*) and the subsequent association between texture and aroma volatiles.

In all, 444 aroma volatile compounds were tentatively identified but only 173 were considered as typical of melon. Finally, 127 compounds matched the consistence criterion described above. The main results in aroma volatiles using total area or percentages were similar and, consequently, only percentages of total area counts are reported.

3.2. Univariate analysis of classes of compounds and QTL mapping

Aldehydes, ketones and alcohols were the major classes of volatile compounds in PS and both NILs. Two groups of compounds discriminated PS and NILs. PS had a 50% higher content of ketones than SC10 2, and SC7 1 had 70% higher content of sulfur derived compounds than PS (Table 1), corresponding to one QTL for total ketone content (in LG X) and another in LG VII for sulfur derived compounds.

3.3. Univariate analysis of individual aroma volatile compounds and QTL mapping

Thirty compounds were the more discriminant volatiles between the NILs and PS, nineteen between SC10 2 and PS and eleven between SC7 1 and PS. Three compounds present in PS were absent from SC10 2, while nine compounds present in SC10 2 and were absent from PS. Four alcohols (i.e. 2 phenylbutan 2 ol) and four aldehydes (i.e. 2 methylpropanal) were the most represented compounds in SC10 2 (Table 2). PS and SC7 1 aroma were closer than PS and SC10 2. In fact the most of the discriminant compounds in SC10 2 were absent or had a similar value in PS and SC7 1. Three ketones (e.g. pentane 2,3 dione) were the most widely represented compounds in SC7 1 (Table 2).

From the above results, nineteen QTLs in LG X were mapped, four with an effect above the PS mean and other five with effect below PS mean. Also, another eleven QTLs were mapped in LG VII, ten with effect above PS mean and one with effect below PS mean.

Fruity, sweet and green, were the potential aromatic notes of the main volatiles described (Table 3; Suppl. Tables 1 and 3).

3.4. Multivariate analysis of classes of volatile compounds

The PLS DA clearly discriminated SC10 2 from PS because SC7 1 was closer to PS, although SC7 1 showed a higher content of sulfur derived compounds than PS (Table 1; Fig. 1). Ketones and terpenes were the most discriminative classes of volatile compounds according to the VIP

and VIM criteria (Suppl. Tables 4 and 5). The first component (PLSDA1 axis; 25.5% total variance explained) discriminated the NILs mainly as a result of their aldehyde content (especially SC10 2) and PS was mainly associated with ketones, terpenes and non acetate esters (Fig. 1). The second component (PLSDA2 axis; 14.3% total variance explained) discriminated PS based on the acetate esters content (Fig. 1).

As regards the RF analysis, ketones were also the class of volatile compound selected as the most discriminant since they made a greater contribution to the classification than the rest of the compound classes. Also, aldehydes, sulfur derived compounds, and acids were described as influential classes (Suppl. Fig. 1).

3.5. Multivariate analysis of individual aroma volatiles

3.5.1. PLS DA of individual aroma volatiles

Nineteen volatile compounds with diverse chemical structures discriminated among the NILs and the control PS according to the first criterion explained above based concerning the proportion of variance explained in the PLS DA analysis (Table 4; Fig. 2). The two first components of PLS DA explained 13.6% (PLSDA1 axis) and 12.8% (PLSDA2 axis) of the total variance and 50% to 100% of the variance of thirteen discriminant volatile compounds (Fig. 2). The PLSDA1 axis discriminated the NILs (left) from PS (right), indicating a general effect of the introgression in the PS aroma content irrespective of the LG considered (VII or X). The PLSDA2 axis discriminated NILs from PS (Fig. 2). Seven compounds discriminated SC7 1 from PS, with pentane 2,3 dione, octan 1 ol and (2R,3S) 3 ethylheptan 2 ol being the first volatile compounds in the classification. Twelve compounds (i.e. 2,4,5 trimethylphenyl)ethanone, 2,4 dimethylbenzaldehyde, 1 phenylethyl acetate, 2 methylbenzaldehyde/4 methylbenzaldehyde and 1 phenylethanone) discriminated SC10 2 from PS (Table 4; Fig. 2). The similarity between SC7 1 and PS was due to the similar presence or absence of ten compounds that also discriminated SC10 2 from PS (Table 4; Suppl. Table 6). Furan 2 carbaldehyde, dihydrofuran 2(3H) one and ethenyl octadecanoate were among the more discriminant volatile compounds for SC10 2 (Table 4).

Three compounds (NID1, NID3 and NID2), with retention times (RT) of 12.376, 20.879 and 21.458 min and a calculated linear retention index (LRI Cal) of 975, 1143 and 1180, respectively, were described as unidentified (NID) (Suppl. Tables 7–9; Suppl. Figs. 2–4).

Although sixty volatile compounds are reported in the VIP list, only thirteen compounds can be regarded as important, particularly the first nine compounds. Mainly, a higher content of five compounds discriminated SC7 1 from PS: pentane 2,3 dione, octan 1 ol, 2 methylbenzaldehyde/4 methylbenzaldehyde, 3,5,5 trimethylcyclopent 2 en 1 one and NID3. Four compounds (2 methylpropanal, 2,4 dimethylbenzaldehyde, 1 (2,4,5 trimethylphenyl)ethanone and 3 methylsulfanypropanal) not present in PS discriminated SC10 2 from PS, mainly (Suppl. Table 2; Suppl. Fig. 5). Six of the first nine compounds were in common to results obtained by the first PLS DA criterion (Table 4). Similar results were obtained according to the VIM criterion, and only one compound (3,5 dimethylcyclohexan 1 ol) was not present in the VIM classification (Suppl. Table 10; Suppl. Fig. 6). Finally, the criterion loading weights (Suppl. Table 11) confirmed the main aroma volatiles identified in the above PLS DA analysis.

3.5.2. RF of individual aroma volatiles

Twenty aromas volatiles were the most discriminant compounds (Table 5; Suppl. Fig. 7), sixteen of them also identified in four PLS DA classifications. In the MDS plots (Suppl. Fig. 8) discrimination between lines was evident but so was the higher similarity between SC7 1 and PS. Nine compounds (in common with PLS DA classifications) discriminated SC7 1 from PS (Table 5).

Again, nine compounds, especially four of them, the aldehydes 2 methylpropanal and 2,4 dimethylbenzaldehyde, the ketone 1 (2,4,5 trimethylphenyl)ethanone and NID1 discriminated SC10 2 from PS (Table 5). Four of the nine volatile compounds (2 phenylpropan 2 ol,

Table 1

Main compound classes identified in the headspace of the fruit of the near-isogenic lines (NILs) SC10-2 ($n = 3$) and SC7-1 ($n = 5$) of melon and the parental line 'Piel de Sapo' (PS) ($n = 21$). Data are expressed as percentage of each compound class with respect to the total normalized areas.

Pedigree							
Compound class ^a	PS		SC10-2		SC7-1		p-Value
	x	SE	x	SE	x	SE	
ALD	33.3	±2.7	41.4	±18.5	43.0	±3.0	NS
KET/LAC	19.8	±1.3	9.9*	±4.8	12.9	±2.0	**
ALC	16.8	±1.2	14.6	±4.8	17.3	±3.2	NS
OTH	6.4	±0.7	9.3	±6.1	5.9	±0.4	NS
NAE	6.3	±0.6	4.3	±2.0	5.0	±1.3	NS
ACE	5.9	±1.2	3.3	±0.2	6.1	±1.5	NS
AHA	2.1	±0.2	2.1	±0.7	2.0	±0.4	NS
SDC	1.5	±0.1	1.3	±0.6	2.5*	±0.6	*
TER	1.4	±0.1	1.0	±0.2	1.2	±0.1	NS
ACD	0.2	±0.0	0.4	±0.2	0.2	±0.1	NS

NIL means followed by an asterisk were significantly different from the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test ($P = 0.05$). SE, standard error. *, **: significance at $P \leq 0.05$ or 0.01 , respectively. NS, non-significant.

^a Compound classes: ACD, acids; ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; LAC, lactones; NAE, non-acetate esters; OTH, others; SDC, sulfur-derived compounds; TER, terpenes.

Table 2

Main volatile compounds identified for QTL mapping in melon linkage class X and VII using near-isogenic lines (NILs) SC10-2 ($n = 3$) and SC7-1 ($n = 5$) respectively, and the parental line 'Piel de Sapo' (PS) ($n = 21$). Volatile compounds were selected for significance of all the univariate and multivariate (PLSDA and RF) statistical criteria described. Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Compounds per NIL ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name	Compound class ^b	IDN ^c	Pedigree			p-Value ^d	MQ ^e
					PS	SC10-2	SC7-1		
NIL SC10-2									
1	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07*	0.02	***	45
2	000096-17-3	2-Methylbutanal	ALD	16	0.00	0.07*	0.01	***	54
3	000098-01-1	Furan-2-carbaldehyde	ALD	41	0.00	0.03*	0.00	****	38
4	000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	0.00	0.24*	0.00	****	90
5	003268-49-3	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	0.00	0.04*	0.03	**	93
6	005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	0.38	0.10*	0.30	****	93
7	000124-18-5	Decane	AHA	66	0.15	0.00*	0.06	**	95
8	NID1	Unidentified	NID	70	0.00	0.32*	0.00	****	-
9	000098-86-2	1-Phenylethanone	KET	75	1.17	0.00*	0.41	*	76
10	001565-75-9	2-Phenylbutan-2-ol	ALC	80	0.33	2.27*	0.00	**	72
11	0096316-89-1	Ethenyl octadecanoate	NAE	83	0.00	0.17*	0.00	***	97
12	000585-74-0/000577-16-2	3-Methylacetophenone/2-methylacetophenone	KET	95	0.36	0.00*	0.26	**	57
13	004621-04-10	4-Propan-2-ylcyclohexan-1-ol	ALC	96	0.30	1.72*	0.44	****	46
14	000076-22-2/000464-49-3	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one/(1R,4R)-1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	ALC	97	0.98	0.63*	0.73	****	98
15	019550-05-1	3,4-Dimethylhexan-2-ol	ALC	98	0.01	0.20*	0.00	****	25
16	NID2	Unidentified	NID	104	0.03	0.32*	0.00	**	-
17	000093-92-5	1-Phenylethyl acetate	ACE	107	0.01	0.20*	0.00	**	81
18	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12*	0.00	***	83
19	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69*	0.09	*	93
NIL SC7-1									
1	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00	0.14*	****	85
2	001534-08-3	S-methyl ethanethioate	SDC	24	0.05	0.00	0.44*	**	87
3	000108-21-4	Propan-2-yl acetate	ACE	-	0.05	0.00	0.21*	***	81
4	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00	0.05*	***	62
5	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00	0.43*	***	50
6	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.05	0.11	0.59*	***	72
7	000529-20-4/000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde/4-methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00	0.07*	**	93
8	NID3	Unidentified	NID	91	0.06	0.44	0.38*	*	-
9	000624-16-8	Decan-4-one	KET	93	0.10	0.23	0.42*	**	35
10	000140-11-4	Benzyl acetate	ACE	100	0.18	0.17	2.13*	***	97
11	074367-31-0	(2-Ethyl-3-hydroxy-hexyl) 2-methylpropanoate	NAE	120	2.28	1.04	0.95*	*	38

NIL means followed by an asterisk were significantly different from the control PS mean according to one-way ANOVA with a pedigree effect followed by a Dunnett test ($P = 0.05$). *, **, ***, ****: significance at $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001 or 0.0001, respectively. Mass spectra unidentified compounds (NID1, NID2, NID3) reported in Supplementary Tables 7–9 and Supplementary Figs. 2–4.

^a Number of compounds identified for QTL mapping per NIL (SC10-2 or SC7-1) and ordered according to IDN.

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound Classes: ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; LAC, lactones; NAE, non-acetate esters; NID, not identified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig. 2). IDN with dash (–) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in Fig. 2.

^d The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion.

^e MQ: Match quality (0–100 units) of spectra compared with those of the National Institute for Standards and Technology (NIST05aL, search version 2.0) data bank.

4 propan 2 yl cyclohexan 1 ol, 1,7,7 trimethylbicyclo[2.2.1]heptan 2 one/(1R,4R) 1,7,7 trimethylbicyclo[2.2.1]heptan 2 one and acetic acid) were not present in the main compounds of PLS DA classifications (Table 4; Suppl. Tables 2, 10 and 11; Fig. 2; Suppl. Figs. 5 and 6).

3.6. Association among textural traits and aroma volatile compounds

Compound classes did not show significant correlations (absolute value lower than 0.5, data not shown) with textural traits (Fig. 1). Nevertheless, as shown in Fig. 2, textural traits and individual volatile compounds showed certain association in discrimination between PS and NILs. Mainly, FF and to a lesser extent WFH (graphic outer crown) were the textural traits most influential on discrimination with significant correlations (Table 6). The strongest positive correlation was observed among some individual volatile compounds and FF (Table 6), with negative correlation with PLS DA1 (Fig. 2B). The strongest negative correlation was observed among other individual volatile compounds and WFH (Table 6), with positive correlation with PLS DA1 (Fig. 2B). The aroma volatile compounds with high correlation (positive or negative; Table 6) in both cases were the one which discriminated

the NILs from PS. The remaining textural traits (JJ, PJ, JD and FJ) did not show clear correlations with differences in volatile compounds between both NILs and PS.

4. Discussion

Flesh firmness was the textural trait more closely associated to nine aroma volatiles as a result of discriminant aroma (Fig. 2) and correlation analysis (Table 6). Several aroma metabolic pathways identified were putatively associated with higher flesh firmness of SC10 2 (Table 3), such as those having amino acids, fatty acids, gamma aminobutyrate and alfa methylstyrene/ethylbenzene as precursors. Flesh firmness depends on environmental factors, growth conditions, and postharvest handling, but fruit texture is a factor largely dependent on genotype (Aurand et al., 2012; Sams, 1999). Cell wall thickness and strength is one of the major contributors to flesh firmness, although several factors are also important and interrelated in physical anatomy of the tissues typical of each genotype and specie, such as cell size, turgor, cuticle properties, or the activity of cell wall degradation enzymes (Chapman, Bonnet, Grivet, Lynn, Graham, Smith et al., 2012; Toivonen & Brummell,

Table 3
Chemical and sensory attributes of the main melon volatile compounds used for QTL mapping in linkage Classes X and VII of Table 2 identified in one of the three melon lines used [near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1 or the parental line 'Piel de Sapo' (PS)].

Compounds per NIL ^a	IUPAC ^{a1} name	Compound class ^b	IDN ^c	RT ^d (min)	LRI	Cal ^e	LRI Ref.	Ref. 1	Volatile precursors	Ref. 2	Aromatic notes	Ref. 3
NIL SC10-2												
1	2-Methylpropanal	ALD	7	1.573	ND	552	1	1	AA	3	Green, pungent, burnt, malty, toasted, fruity	27
2	2-Methylbutanal	ALD	16	2.239	653	682	1	1	AA	4,5,6,7,8	Green, almond, strong burnt, malty, cocoa	27
3	Furan-2-carbaldehyde	ALD	41	5.788	837	838	1	1	Furan	9	Woody, almond, sweet, fruity, flowery	28
4	Dihydrofuran-2-(3H)-one	LAC	51	9.112	916	922	1	1	GABA	10	Cream, oil, fat, caramel	27, 29
5	3-Methylsulfonylpropanal	SDC	52	8.496	905	911	1	1	AA	Met	Cooked potato	30
6	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	13.535	996	NR	1	1	CH-ol	11	Not found	28
7	Decane	AHA	66	13.920	1003	1000	1	1	FAS	Saturated fatty acyl chains	Fusel-like, fruity, sweet	
8	Unidentified	NID	70	12.376	975	–	–	–	–	–	–	
9	1-Phenylethanol	KET	75	18.304	1070	1070	1	1	AMS	12	Sweet, pungent, hawthorn, mimosa, almond, acacia chemical.	27
10	2-Phenylbutan-2-ol	ALC	80	19.316	1086	NR	–	–	AA	13	Not found	
11	Ethyl octadecanoate	NAE	83	20.635	1127	NR	–	–	FAS	14	Not found	
12	3'-Methylacetophenone/2'-methylacetophenone	KET	95	21.020	1152	1176	1	1	ACP	14	Not found	
13	4-Propan-2-ylcyclohexan-1-ol	ALC	96	20.998	1150	1130	1	1	TER	14	Leather, red rose, green, dusty, weedy, metallic	31
14	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one/(1R,4R)-1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	ALC	97	21.091	1156	1151	1	1	α-Phene	14	Camphor, minty, phenolic, herbal, wood; strong penetrating pungent aromatic odor; camphor.	27, 32, 33
15	3,4-Dimethylhexan-2-ol	ALC	98	21.262	1167	NR	–	–	FAS	–	Not found	
16	Unidentified	NID	104	21.458	1180	–	–	–	–	–	–	
17	1-Phenylethyl acetate	ACE	107	21.731	1197	1186	1	1	AA	15	Not found	
18	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanol	KET	108	21.598	1189	NR	–	–	ACP/EB	14	Not found	
19	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	21.892	1220	1175	1	1	AA	16,17	Naphthyl, cherry, almond, spice, vanilla	31
NIL SC7-1												
1	Pentane-2,3-dione	KET	22	2.639	698	670	2	2	AA	18,19	Caramel, sweet, fruity, buttery, fresh	27
2	S-methyl ethanethioate	SDC	24	2.688	701	NR	1	1	AA	20,21,22	Sulfurous, eggy, cheese, dairy, vegetable, cabbage	31
3	1-Methylethyl acetate	ACE	–	2.271	609	662	1	1	IPA	23	Fruity, ethereal, sweet, banana with a slight compound nuance	27
4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	5.355	826	832	1	1	CAR	24	Top note of Osmanthus fragrans (sweet osmanthus)	34
5	(2R,3S)-3-Ethylheptan-2-ol	ALC	76	18.870	1078	NR	–	–	FAS	25	Not found	
6	Octan-1-ol	ALC	79	18.578	1075	1087	1	1	FAS	25	Fatty, green, herbal	35
7	2-Methylbenzaldehyde/4-methylbenzaldehyde	ALD	81	18.688	1076	1067/1081	1	1	AA	16,17	Warm, mild, floral, sweet, spicy	28
8	Unidentified	NID	91	20.879	1143	–	–	–	–	–	–	
9	Decan-4-one	KET	93	20.979	1149	NR	–	–	FAS	11	Not found	
10	Benzyl acetate	ACE	100	21.419	1177	1165	1	1	AA	4	Floral, burnt, boiled zucchini	27
11	(2-Ethyl-3-hydroxy-hexyl) 2-methylpropanoate	NAE	120	13.771	1376	1375	1	1	FAS	26	Not found	

Abbreviations and acronyms: LRI, linear retention time; LRI Ref., literature references for LRI (Ref.1), volatile precursors (Ref.2) or aromatic notes (Ref.3); AA, amino acid; ACP, acetophenone; AMS, allylphenylstyrene; CAR, carotenoids; CH-ol, cyclohexanol; EB, ethylbenzene; FAS, fatty acids; GABA, gamma-aminobutyrate; IPA, isopropanol; Iso, L-leucine; Met, L-methionine; NR, not reported in literature search; Phe, L-phenylalanine; TER, terpenes; Thr, L-threonine; Try, L-tryptophan; Val, L-valine.

^a Number of volatile compounds identified for QTL mapping per NIL (SC10-2 or SC7-1) and ordered according to IDN.

^{a1} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound Classes: ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; LAC, lactones; NAE, non-acetate esters; NID, not identified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig. 2). IDN with dash (–) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in Fig. 2.

^d RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound.

^e LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6–C20).

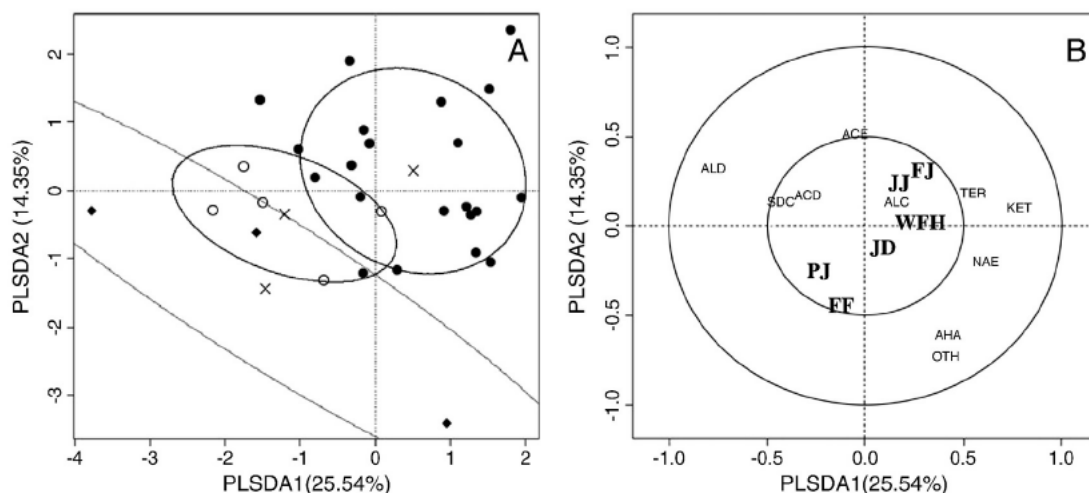


Fig. 1. Discrimination among melon near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (◆) and SC7-1 (○) and the parental control 'Piel de Sapo' (PS, ●) by compound classes of fruit aroma volatiles according to Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). A. Datasets and the corresponding centroids (x) for the different lines and 65% confidence ellipses. B. Correlations between compound classes and the first two components. The abbreviations in the graph on the right correspond to the compound classes and textural traits included in the analysis. ACE, acetate esters; ACD, acids; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; AHA, alkanes; FF, flesh firmness; JJ, flesh juiciness; JF, juice density; JC, juiciness; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; OTH, others; PJ, pellet content of the juice; SDC, sulfur-derived compounds; TER, terpenes; WFFH, whole fruit hardness.

2008). Differences in cell wall composition of melon NILs with higher flesh firmness other than NIL SC10 2 have been previously described (Dos Santos et al., 2011). In tomato, QTLs affecting flesh textural traits and volatiles have been identified (Aurand et al., 2012; Causse, 2008; Causse, Saliba Colombari, Lecomte, Duffe, Rousselle and Buret, 2002; Chapman et al. 2012; Mathieu et al., 2009). However, in contrast with the correlation found here for flesh firmness and whole fruit hardness

(Table 6), the correlation among texture and aroma traits has been generally low and not modeled (Causse et al., 2002).

The similar flesh firmness of NIL SC7 1 and PS was matched by similarities in aroma between them, although only a possible indirect link between whole fruit hardness and differential flesh aroma (Tables 3 and 6) could be established. Aroma QTLs were found in SC7 1 that showed no difference in flesh and juice textural properties from PS,

Table 4

Main volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n = 3) and SC7-1 (n = 5) of melon and the parental line 'Piel de Sapo' (PS) (n = 21). The compounds were selected with 50% or more of the variance explained by the two components according to the Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Order ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name ^b	Compound class ^c	IDN ^d	r-distance ^e	Pedigree			p-Value ^f
						PS	SC10-2	SC7-1	
1	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.915	0.00	0.69*	0.09	***
2	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.896	0.00	0.00	0.14*	****
3	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.879	0.00	0.69*	0.09	*
4	NID1	Unidentified	NID	70	0.868	0.00	0.32*	0.00	****
5	0096316-89-1	Ethenyl octadecanoate	NAE	83	0.864	0.00	0.17*	0.00	****
6	000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	0.863	0.00	0.24*	0.00	****
7	000093-92-5	1-Phenylethyl acetate	ACE	107	0.841	0.01	0.20*	0.00	**
8	000098-01-1	Furan-2-carbaldehyde	ALD	41	0.828	0.00	0.03*	0.00	****
9	005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	0.823	0.38	0.10*	0.30	****
10	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.811	0.05	0.11	0.59*	***
11	NID2	Unidentified	NID	104	0.799	0.03	0.32*	0.00	**
12	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.786	0.03	0.00	0.43*	***
13	000098-86-2	1-Phenylethanone	KET	75	0.735	1.17	0.00*	0.41	*
14	003214-41-3	Octane-2,5-dione	KET	-	0.728	0.03	0.12	0.14	NS
15	000529-20-4/000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde/4-methylbenzaldehyde	ALD	81	0.727	0.00	0.00	0.07*	**
16	000585-74-0/000577-16-2	3'-Methylacetophenone/2'-methylacetophenone	KET	95	0.724	0.36	0.00*	0.26	**
17	000124-18-5	Decane	AHA	66	0.724	0.15	0.00*	0.06	**
18	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.721	0.00	0.00	0.05*	***
19	001534-08-3	S-Methyl ethanethioate	SDC	24	0.720	0.05	0.00	0.44*	**

NIL means followed by an asterisk were significantly different of the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test ($P = 0.05$). *, **, ***, ****: significance at $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001 or 0.0001, respectively. NS, non-significant. Mass spectra unidentified compounds (NID1, NID2) reported in Supplementary Tables 7–9 and Supplementary Figs. 2–4.

^a Order of the volatile compounds according to the percentage of variance explained criterion (50%–100% variance explained or 0.7–1 distance from the origin in correlation plot).

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Properties of these compounds reported in Table 3 except octane-2,5 dione (IDN = 61; LRI Cal. = 988; LRI Ref. = 986; RT = 13.069 min).

^c Compound classes: ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; LAC, lactones; NID, not identified; SDC, sulfur-derived compounds.

^d IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig. 2). IDN with dash (-) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in the Fig. 2.

^e Distance to the origin in correlation plot.

^f The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion. Original data were transformed for statistical analysis by substituting the zero-values by the minimum non-zero value observed and applying the log-transformation (base 2).

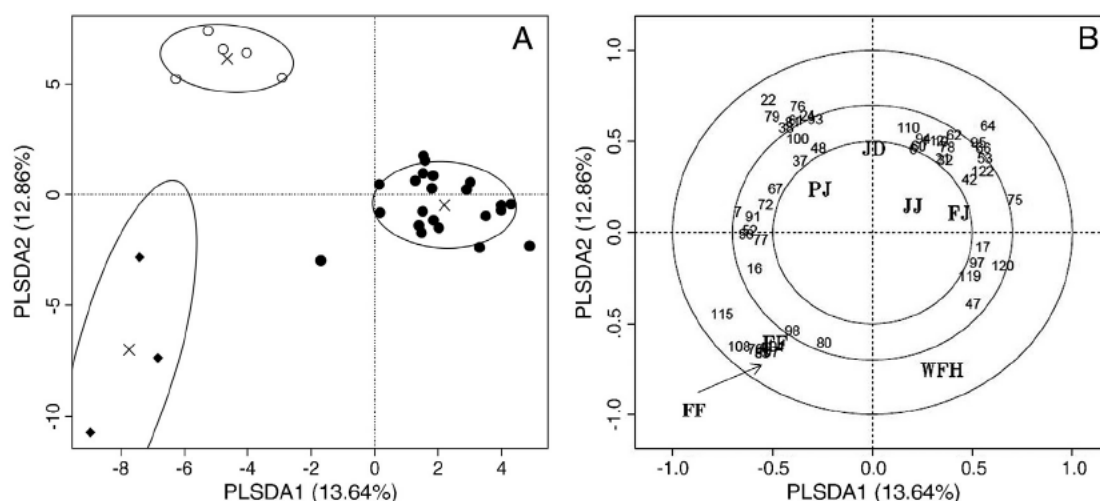


Fig. 2. Discrimination among the melon near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (◆) and SC7-1 (○) and the parental control 'Piel de Sapo' (PS, ●) by individual fruit aroma compounds according to Partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). A. Datasets and the corresponding centroids (x) for the different lines and 65% confidence ellipses. B. Correlations between the individual volatile compounds, the textural traits and the first two components. The numbers in the graph on the right correspond to the compounds with 25% or more of the variance explained by the two components according to the PLS-DA and numbered according to Table 4. The abbreviations in the graph correspond to the textural traits included in the analysis. FF, flesh firmness; FJ, flesh juiciness; JD, juice density; JJ, juiciness; PJ, pellet content of the juice; WFH, whole fruit hardness.

while SC10 2 showed firmer texture and other textural properties with a strongest correlation among flesh firmness and volatile compounds (Table 6), which may have had a matrix effect on aroma volatile measurements. Differences in the juice matrix can modify the concentration of the aroma compounds in the headspace (Bezman et al., 2003). Some

information indicating differential textural properties and the corresponding QTLs has been previously reported in SC10 2 (Moreno et al., 2008; Obando et al., 2008).

About thirty QTLs were associated with aroma volatiles in non climacteric melon NILs. Obando Ulloa, Ruiz, Monforte, and Fernández

Table 5

Main volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n = 3) and SC7-1 (n = 5) of melon and the parental line 'Piel de Sapo' (PS) (n = 21). The compounds were screened according to the Random forest (RF) analysis. The criterion RF1 was based on the mean decreases in accuracy and the criterion RF2 was based on mean decreases in the Gini index. Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Order ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name ^b	Compound class ^c	IDN ^d	Pedigree			Order RF1	Order RF2	p-Value ^e
					PS	SC10-2	SC7-1			
1	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00	0.14*	1	3	****
2	000140-11-4	Benzyl acetate	ACE	100	0.18	0.17	2.13*	2	2	***
3	NID3	Unidentified	NID	91	0.06	0.44	0.38*	3	1	*
4	000624-16-8	Decan-4-one	KET	93	0.10	0.23	0.42*	4	5	**
5	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00	0.43*	5	6	***
6	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07*	0.02	6	11	***
7	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.05	0.11	0.59*	7	4	***
8	NID1	Unidentified	NID	70	0.00	0.32*	0.00	8	7	**
9	001534-08-3	5-methyl ethanethioate	SDC	24	0.05	0.00	0.44*	9	9	**
10	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69*	0.09	10	10	*
11	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12*	0.00	11	8	***
12	000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	0.00	0.24*	0.00	12	24	****
13	004621-04-10	4-Propan-2-ylcyclohexan-1-ol	ALC	96	0.30	1.72*	0.44	13	14	****
14	000617-94-7	2-Phenylpropan-2-ol	ALC	78	2.53	0.24*	2.00	14	12	*
15	003268-49-3	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	0.00	0.04*	0.03	15	19	**
16	000529-20-4/000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde/4-methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00	0.07*	16	15	**
17	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00	0.05*	17	28	***
18	000076-22-2/000464-49-3	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one/(1R,4R)-1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	ALC	97	0.98	0.63*	0.73	NR	13	****
19	005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	0.38	0.10*	0.30	36	16	****
20	000064-19-7	Acetic acid	ACD	-	0.11	0.30*	0.11	NR	17	NS

NIL means followed by an asterisk were significantly different of the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test ($P = 0.05$). *, **, ***, ****: significance at $P \leq 0.05$, 0.01, 0.001 or 0.0001, respectively. NS, non-significant.

Mass spectra of unidentified compounds (NID1, NID3) reported in Supplementary Tables 7 and 9 and Supplementary Figs. 2 and 4.

^a Order of the main volatile compounds according to criteria RF1 (compounds 1–17) and RF2 (compounds 18–20).

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Properties of these compounds reported in Table 3 except acetic acid (IDN = 11; LRI Cal. = 609, LRI Ref. = 600; RT = 1.831 min; MQ = 53).

^c Compound classes: ACD, acids; ACE, acetate esters; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; LAC, lactones; NID, not identified; SDC, sulfur-derived compounds.

^d IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig. 2). IDN with dash (-) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in the Fig. 2.

^e The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion. Original data were transformed for statistical analysis by substituting the zero-values by the minimum non-zero value observed and applying the log-transformation (base 2).

Table 6

Pearson's correlation coefficients between textural traits and volatile compounds in near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n = 3) and SC7-1 (n = 5) of melon and the parental line 'Piel de Sapo' (PS) (n = 21). Only correlations in absolute value higher than 0.5 are shown.

Volatile compounds		IDN ^b	Textural traits					
CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name		FF ^c	WFH ^d	PJ ^e	FJ ^f	JD ^g	JJ ^h
000067-64-1	Acetone	–						0.64
000079-20-9	Methyl acetate	–	0.50					
000078-93-3	Butan-2-one	–	0.50					
017528-72-2	Pent-1-en-3-one	–	0.55					
000600-14-6	Pentane-2,3-dione	22		0.85			0.51	
001534-08-3	S-methyl ethanethioate	24		0.64				
000105-37-3	Ethyl propanoate	27				0.51		
000066-25-1	Hexanal	–	0.52					
024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	38		0.57	0.52			
000098-01-1	Furan-2-carbaldehyde	41	0.56					
000111-27-3	Hexan-1-ol	–	0.60					
000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	51	0.62					
000591-23-1	3-Methylcyclohexan-1-ol	–	0.57					
005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	64	0.56					
000124-18-5	Decane	66	0.65					
070424-13-4	2-[(Z)-pent-2-enyl]furan	–			0.59			
NID1	NID1	70	0.71					
000104-76-7	2-Acetyloxypropyl acetate	71						0.51
019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	76		0.67				
000111-87-5	Octan-1-ol	79		0.59				
001565-75-9	2-Phenylbutan-2-ol	80	0.51					
000529-20-4/000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde/4-methylbenzaldehyde	81		0.63				
0096316-89-1	Ethenyl octadecanoate	83	0.63					
NID3	NID3	91				0.52		
000585-74-0/000577-16-2	3'-Methylacetophenone/2'-methylacetophenone	95	0.62					
000140-11-4	Benzyl acetate	100		0.61				
NID2	NID2	104	0.58					
000093-92-5	1-Phenylethyl acetate	107	0.60					
002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	108	0.77					
015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	115	0.65					
000103-45-7	2-Phenylethyl acetate	116		0.52				

Volatile compounds in bold showed significant differences according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test (P = 0.05). Data in Tables 2, 4 and 5.

^{a1} CAS, compound abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig. 2). IDN with dash (–) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in the Fig. 2.

^c FF, flesh firmness.

^d WFH, whole fruit hardness.

^e PJ, pellet content of the juice.

^f FJ, flesh juiciness.

^g JD, juice density.

^h JJ, juiciness.

Trujillo (2010) mapped four QTLs associated with the aroma profile of non climacteric NILs in linkage groups not studied here. With the exception of a few non climacteric fruit such as strawberry (Zorrilla Fontanesi et al., 2012), the QTLs of volatile compounds have been mapped mostly in climacteric fruit at harvest or during ripening (Causse et al., 2002; Eduardo, Chietera, Pirona, Pacheco, Troggo, Banchi, et al., 2013; Mathieu et al., 2009; Zini, Biasioli, Gasperi, Mott, Aprea, Mark, et al., 2005).

The high number of QTLs mapped here could explain in part the low percentage of variance explained by PLS DA, which was an indicator of the low correlation between the volatiles found in the experiment. Also, this low variance explained could be an indicator of the many potential pathways involved in melon aroma volatiles (Table 3), even in non climacteric fruit, confirming that although *Inodorus* non climacteric melons are usually non aromatic, flesh aroma volatiles are relatively complex, particularly in C9 compounds (Gonda et al., 2010, 2013; Kourkoutas, Elmore, & Mottram, 2006; Verzera, Dima, Tripodi, Ziino, Lanza and Mazzaglia, 2011). At least, one QTL in LG VII is associated to the methionine metabolic pathway (Arfi, Landaud, & Bonnarme, 2006; Gonda et al., 2013; Ott, Germond, & Chaintreau, 2000; Singh et al., 2003; Varlet & Fernández, 2010) and another two QTLs could also be mapped in LG VII, which were related to the shikimic pathway (Gonda et al., 2010; Mahmuda & Ueda, 2008) and carotenoid

degradation (Leffingwell, 1999), respectively (Table 3). At least two QTLs related to the aldehyde content (amino acids being the principal precursors) and greater flesh firmness were mapped in LG X (Table 3), one related to the benzenoid biosynthetic pathway (Ribnicky, Shulaev, & Raskin, 1998; Van Moerkercke, Schauvinhold, Pichersky, Haring, & Schuurink, 2009) and the other related to aldehyde production via their corresponding α keto acid (Gonda et al., 2010; Pang et al., 2012; Qi, Guan, Li, & Jing, 2012; Smit, Engels, & Smit, 2009).

The introgression of SC10 2 covered the entire LG X and for SC7 1 was smaller (Eduardo et al., 2005). Due to the length of these introgressions in the PS genetic background, particularly in LG X, some of the QTLs of the aroma volatiles could be independent of textural traits. Because of that NILs with smaller introgressions should be tested in the future.

As regards the methods used to analyze aroma volatiles, all criteria (six) from the multivariate analysis (PLS DA and RF) showed greater discrimination between the firmer NIL SC10 2 and PS than between NIL SC7 1 and PS (Fig. 2; Suppl. Fig. 8), both as regards individual aroma volatiles and compound classes (Fig. 1). In summary, seven compounds acted as discriminant aroma volatiles for all the multivariate analyses performed, while another seven were slightly less consistent and were confirmed by four at least of the six multivariate criteria. Only five compounds were confirmed by one criterion (Suppl. Table 12). However,

PLS DA showed better discrimination between the NILs (especially SC10 2) and PS as regards individual aroma volatiles than the RF analysis according to confusion matrices (Suppl. Table 13), and the same was true when compound classes were analyzed (data not shown). PLS DA has previously been applied to aroma volatile studies but usually using a smaller number of input variables (Obando Ulloa et al., 2008). RF gave better discrimination than PLS DA for other melon quality traits, including sensory traits at harvest (Fernández Trujillo et al., 2009; Obando Ulloa, Jowkar, Moreno, Souri, Martínez, Bueso, et al., 2009).

The first two PLS DA components explained a lower percentage of the variance considering individual volatile compounds than when considering compound classes (Figs. 1 and 2). The low percentage of variance explained by PLS DA using individual volatile compounds (Fig. 2) was confirmed by launching the multivariate analysis using only twenty variables (data not shown).

The variables measured had low correlation and greater independence, which suggests that several processes of aroma biosynthesis are functioning independently. Obando Ulloa et al. (2008) also used PLS DA and obtained better percentage of the variance explained in the discrimination of climacteric NILs with introgressions in LG III from PS. Also, PLS DA is less effective at separating PS and one non climacteric PS type hybrid than at separating climacteric lines and PS (Obando Ulloa et al., 2008).

Aldehydes and, to a lesser extent, alcohols and ketones were the compound class that best characterized the aroma profile of the non climacteric parental PS (Table 1), in agreement with previous results (Obando Ulloa et al., 2008, 2010). The main differences between both NILs and PS seem to be associated with the ketones and sulfur derived compounds and the higher aldehyde content (Table 1; Fig. 1), particularly compounds derived from the L amino acids phenylalanine, isoleucine, valine and leucine pathways (Table 3; Suppl. Tables 1 and 3). Differences in volatiles among NILs and PS were probably mainly associated with differences in enzymatic activities in the amino acid pathways rather than limited by the availability of amino acids as substrate, because only a higher concentration of valine (51%) but not of other potential amino acid precursors was found in SC10 2 (data not shown).

In previous investigations (Obando Ulloa et al., 2010), noticeable differences were found between the aroma profile of NIL SC10 2 and control PS, but no QTLs were mapped in that work. The NIL SC10 2 was characterized by a lower ketone content than PS (Table 1) that could be associated with differences in the metabolism of acetophenone or the ethylbenzene (Table 3). The ketone 1 phenylethanone, detected in PS and absent in NIL SC10 2 (Tables 2 and 3), has been described in bacteria as a product of two sequential dehydrogenation reactions of ethylbenzene to (S) 1 phenylethanol until 1 phenylethanone (Kniemeyer & Heider, 2001).

As regards other metabolic pathways associated with the differences between PS and SC10 2 QTLs and volatiles, these were related in part to the free L amino acid metabolism, in which phenylalanine, valine, isoleucine and leucine (Table 3) are considered aroma precursors (Gonda et al., 2010; Qi et al., 2012; Smit et al., 2009). The higher aldehyde content, mainly 2,4 dimethylbenzaldehyde, furan 2 carbaldehyde, 2 methylpropanal and/or 2 methylbutanal, all of which were absent from PS (Tables 2, 4 and 5), characterized the firmer NIL SC10 2. The aldehydes, 2 methylbutanal and 2 methylpropanal, are potent flavor compounds obtained via the corresponding α keto acid and are regarded as key flavor compounds in many foods (Smit et al., 2009), particularly in melon fruit (Gonda et al., 2010). The volatile compound, 2 methylpropanal, an intermediate in the catabolism of leucine and valine, is converted into 2 methyl propanoic acid or 2 methyl propanol (Gonda et al., 2010; Smit et al., 2009). 2 methylbutanal, which is obtained from L isoleucine conversion, is converted to its corresponding branched chain alcohol 2 methylbutanol, and then, to its corresponding ester butanol 2 methyl acetate, a typical acetic ester present in climacteric melon fruits (Gonda et al., 2010; Pang et al., 2012; Qi et al., 2012).

The difference in the aldehyde content between PS and SC10 2 could be due to the reduced conversion of aldehydes into alcohols and the subsequent conversion into esters (Mahmuda & Ueda, 2008), partly because of the greater flesh firmness of the NIL and the corresponding lower availability of substrates. As regards the cell wall structure, high levels of uronic acids and neutral sugars (especially galactose, cellulose and α cellulose residue) have been related with higher flesh firmness in another non climacteric NIL with an introgression in LG VII (Dos Santos et al., 2011). This differential composition contributes to maintaining and strengthening the network structure, reducing cell disruption and, therefore, the formation of new volatiles (Baldwin, Scott, Shewmaker, & Schuch, 2000).

The formation of 2,4 dimethylbenzaldehyde could follow the benzenoid biosynthetic pathway via phenylalanine (Table 3). Benzaldehyde has been described as an intermediate in the formation of benzoic acid via trans cinnamic acid following a non oxidative pathway. Trans cinnamic acid is derived from phenylalanine as the product of phenylalanine ammonia lyase (Ribnicky et al., 1998; Van Moerkercke et al., 2009).

The L amino acids, mainly phenylalanine and methionine, were the most important metabolism precursors of the volatile compounds of the main discriminant compounds in NIL SC10 2 (Table 3). Fatty acids involved in alcohol metabolism or carotenoid degradation (Leffingwell, 1999) were the other potential precursors described here such as for example the ketone 3,5,5 trimethylcyclopent 2 en 1 one (Table 3).

As regards the metabolic pathways involved in the higher sulfur derived compound content of SC7 1 compared with PS (Table 1), S methyl ethanethioate is related to the L methionine (Met) metabolism (Table 3; Suppl. Tables 1 and 10). L methionine has been postulated to serve as a precursor of sulfur containing aroma volatiles (Gonda et al., 2013), which are important contributors to the distinctive aroma of melon. The former pathway could involve the enzymatic degradation of the amino acid cysteine from methionine, giving methanethiol, and the subsequent production of sulfur derived compounds, such as S methyl ethanethioate (Varlet & Fernández, 2010), or other volatile compounds, such as pentane 2,3 dione (Table 3), which is obtained in certain microorganisms via the catabolism of methionine as a result of 4 methylthio 2 oxobutyric acid degradation (Arfi et al., 2006; Ott et al., 2000). Methanethiol has previously been reported as an aroma volatile in fruits of melon NILs (Obando Ulloa et al., 2010).

Other important compounds for SC7 1 are 1 octanol and benzyl acetate. The alcohol obtained from the alkane n octane is a precursor of the aldehyde 1 octanal, via alcohol dehydrogenase (Wills, Stephen, & Bryan, 2012). The ester benzyl acetate is predominant in certain melon types (Song & Forney, 2007) and is usually produced via the shikimic pathway by the reduction of benzaldehyde to benzyl alcohol by the enzyme benzyl alcoholacetyl transferase (Gonda et al., 2010; Mahmuda & Ueda, 2008). Although some degree of cultivar dependence exists in the production of benzyl acetate according to results using melon disks (Mahmuda & Ueda, 2008), the higher benzyl acetate content of NIL SC7 1 could be related with the greater conversion of benzaldehyde into benzyl acetate from amino acids via transamination, as indicated by the results obtained in melon cubes (Gonda et al., 2010). Finally, the pathway of the aldehyde 2 methylbenzaldehyde/4 methylbenzaldehyde has been described above.

Although further research is required, the association between compounds and metabolic pathways is the key in future investigation to identify candidate genes in LG VII or X or new QTLs associated with melon texture and aromas of interest to consumers.

5. Conclusions

The introgressions in LG VII and X did not affect the melon climacteric behavior but higher flesh firmness, lower whole fruit hardness and different juice textural properties were observed in LG X. The higher flesh firmness of the NIL SC10 2 was mainly associated with

nine aroma volatiles linked to aroma pathways which putative precursors are L amino acids, fatty acids, gamma aminobutyrate and alfa methylstyrene/ethylbenzene. The aldehydes potentially derived from the L amino acids phenylalanine, leucine, valine and isoleucine (with QTLs mapping in LG X), seen to be potential biomarkers of flesh firmness. They may hinder aldehyde conversion into alcohols or esters due to the juice having a potential matrix effect resulting, in part, from lower flesh juiciness of NIL SC10 2. The NIL SC7 1 with lower whole fruit hardness showed less pronounced differences in aroma volatiles with the PS parental than the NIL SC10 2, as revealed by the better discrimination obtained using PLS DA than with the RF analysis. Even so, thirty two QTLs in both introgressions were mapped for aroma volatiles: twenty in LG X (one for the ketones and nineteen for individual compounds mainly associated with the aldehydes resulting from amino acid degradation) and twelve in LG VII (one for the sulfur derived compounds group and the rest for individual compounds associated with the L methionine or shikimic pathways and carotenoid degradation). Univariate and multivariate statistical methods confirmed the consistency of the results. The differences found in sulfur derived compounds and L methionine metabolism between SC7 1 and PS could be related in part to the lower hardness of this NIL compared with PS.

Acknowledgments

This work was supported by the Ministry of Innovation and Science (now, the Ministry of Economy and Competition) and European Union FEDER funds (AGL2010 20858), Fundación Séneca de la Región de Murcia (projects 11784/PI/09 and 05676/PI/07), and Consejería de Educación de la Región de Murcia (BIO AGR06/02 0011). N. D. S. acknowledges the FPU MEC AP2006 01565 fellowship (Ministry of Education of Spain). Thanks are due to IRTA CRAG for providing the seeds of the NILs and Dr. A. J. Monforte (IBMCP, Valencia) for his valuable comments. We acknowledge the assistance of P. Varó and his team in CIFEAT Torre Pacheco for crop management. Thanks are also given to C. Miranda, M. J. Ferrer and J. Obando for fruit harvesting and sampling, and M. A. Quesada and SAIT UPCT for the GC/MS analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.031>.

References

- Abrahão, C., Miguel, A.C. A., Dias, J. R. P.S., Spoto, M. H. F., & da Silva, P. P.M. (2009). Consumer profile evaluation by quality function development for melon. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 716–720.
- Amaro, A. L., Fundo, J. F., Oliveira, A., Beaulieu, J. C., Fernández-Trujillo, J. P., & Almeida, D. P. F. (2013). 1-Methylcyclopropane effects on temporal changes of aroma volatiles and phytochemicals of fresh-cut cantaloupe. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 828–837.
- Arfi, K., Landaud, S., & Bonnamy, P. (2006). Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2155–2162.
- Aurand, R., Faurobert, M., Page, D., Maingonnat, J. F., Brunel, B., Causse, M., et al. (2012). Anatomical and biochemical trait network underlying genetic variations in tomato fruit texture. *Euphytica*, 187, 99–116.
- Baldwin, E. A., Scott, J. W., Shewmaker, C. K., & Schuch, W. (2000). Flavor trivia and tomato aromas: Biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience*, 35, 1013–1022.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B: Statistical Methodology*, 57, 289–300.
- Bezdan, Y., Mayer, F., Takeoka, G. R., Buttery, R. G., Ben Oueli, G., Rabinowitch, H. D., et al. (2003). Differential effects of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 722–726.
- Box, G. E. P., & Cox, D. R. (1964). An analysis of transformation. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 26, 211–252.
- Causse, M. (2008). Genetic background of flavour: The case of tomato. In B. Brückner, & S. G. Wyllie (Eds.), *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects* (pp. 229–253). Abington, Cambridge, UK: Woodhead Pub. Ltd.
- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lecomte, L., Duffe, P., Rousselle, P., & Buret, M. (2002). QTL analysis of fruit quality in fresh market tomato: A few chromosome regions control the variation of sensory and instrumental traits. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2089–2098.
- Chapman, N. H., Bonnet, J., Grivet, L., Lynn, J., Graham, N., Smith, R., et al. (2012). High-resolution mapping of a fruit firmness-related quantitative trait locus in tomato reveals epistatic interactions associated with a complex combinatorial locus. *Plant Physiology*, 159, 1644–1657.
- Dos-Santos, N., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., & Fernández-Trujillo, J. P. (2011). Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon and their inbred parents which show differential flesh firmness and physiological behavior. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 7773–7784.
- Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2005). Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI 161375. *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 139–148.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troggio, M., Banchi, E., et al. (2013). Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genetics & Genomes*, 9, 189–204.
- Ezura, H., & Owino, W. O. (2008). Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Science*, 175, 121–129.
- Fernández-Trujillo, J. P., Obando, J., Martínez, J. A., Alarcón, A., Eduardo, I., Arús, P., & Monforte, A. J. (2005). Gestión de la calidad de experimentos con frutos de una colección de líneas casi isogénicas de melón. In J. Atienza, & Rabaseda, J. (coords.), *Actas del Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios*. Congreso III IBEROLAB, Madrid, Spain, pp. 149–158.
- Fernández-Trujillo, J. P., Obando-Ulloa, J. M., Monforte, A. J., Sanmartín, P., Kessler, M., & Bueso, M. C. (2009). Métodos estadísticos multivariantes aplicables a estudios de calidad postcosecha del fruto de melón. In Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino, I. Alsina, M. I. Martín de la Hinojosa, & H. Hooghuis (Eds.), *Libro de Comunicaciones del V Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios* (pp. 13–21). Madrid, Spain: Congreso V IBEROLAB.
- Gabrielsson, J., & Trygg, J. (2006). Recent developments in multivariate calibration. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 243–255.
- Gomes, H., Fundo, J., Obando-Ulloa, J. M., Almeida, D. P. F., & Fernández-Trujillo, J. P. (2009). The genetic background of quality and cell wall changes in fresh-cut melons. *Acta Horticulturae*, 877, 1011–1018.
- Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A. A., et al. (2010). Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *The Journal of Experimental Botany*, 61, 1111–1123.
- Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., et al. (2013). Catabolism of L-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *The Plant Journal*, 74, 458–472.
- Harker, F. R., & Johnston, J. (2008). Importance of texture in fruit and its interaction with flavor. In B. Brückner, & S. G. Wyllie (Eds.), *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects* (pp. 254–271). Abington, Cambridge, UK: Woodhead Pub. Ltd (Chapter 7).
- Husson, F., Josse, J., Le, S., & Mazet, J. (2012). FactoMineR: Multivariate exploratory data analysis and data mining with R. R package version 1.18. <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>
- Karp, N. A., Griffin, J. L., & Lilley, K. S. (2005). Application of partial least squares discriminant analysis to two-dimensional difference gel studies in expression proteomics. *Proteomics*, 5, 81–90.
- Kniemeyer, O., & Heider, J. (2001). (S)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Archives of Microbiology*, 176, 129–135.
- Kourkoutas, D., Elmore, J. S., & Mottram, D. S. (2006). Comparison of the volatile compositions and flavour properties of cantaloupe, Galia and honeydew muskmelons. *Food Chemistry*, 97, 95–102.
- Kuhn, M. (2013). Contributions from Wing, J., Weston, S., Williams, A., Keefer, C., Engelhardt, A., Cooper, T. caret: Classification and regression training. R package version 5.15-052. <http://CRAN.R-project.org/package=caret>
- Leffingwell, J. C. (1999). Osmanthus. Leffingwell & Associates. <http://www.leffingwell.com/osmanthus.htm> (Access 20.06.2013)
- Liaw, A., & Wiener, M. (2002). Classification and regression by randomForest. *R News*, 2, 18–22.
- Mahmuda, K. M., & Ueda, Y. (2008). Bioconversion of aliphatic and aromatic alcohols to their corresponding esters in melons (*Cucumis melo* L., cv. Prince Melon and cv. Earls favorite melon). *Postharvest Biology and Technology*, 50, 18–24.
- Mathieu, S., Dal Cin, V., Fei, Z., Li, H., Bliss, P., Taylor, M. G., et al. (2009). Flavour compounds in tomato fruits: Identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *The Journal of Experimental Botany*, 60, 325–337.
- Moreno, E., Obando, J., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J. P., Monforte, A. J., & García-Mas, J. (2008). Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theoretical and Applied Genetics*, 116, 589–602.
- Navarro, V. (1997). The search of the long life in melon. In A. Namesny (Ed.), *Compendios de Horticultura 10. Melones* (pp. 35–40). Reus, Spain: Ed. Horticultura (Chapter 4).
- Obando, J., Fernández-Trujillo, J. P., Martínez, J. A., Alarcón, A. L., Eduardo, I., Arús, P., et al. (2008). Identification of quantitative trait loci of melon fruit quality traits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 133, 139–151.
- Obando-Ulloa, J. M., Jowkar, M. M., Moreno, E., Souri, M. K., Martínez, J. A., Bueso, M. C., et al. (2009). Discrimination of climacteric and non-climacteric melon fruit at harvest

- or at the senescence stage by quality traits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1743–1753.
- Obando-Ulloa, J., Moreno, E., Garcia-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A. J., et al. (2008). Climacteric or non-climacteric behaviour in melon fruit. 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biology and Technology*, 49, 27–37.
- Obando-Ulloa, J. M., Ruiz, J., Monforte, A. J., & Fernández-Trujillo, J. P. (2010). Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon. *Food Chemistry*, 118, 815–822.
- Ott, A., Germond, J. E., & Chaintreau, A. (2000). Vicinal diketone formation in yogurt: C-13 precursors and effect of branched-chain amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 724–731.
- Pang, X. L., Guo, X. F., Qin, Z. H., Yao, Y. B., Hu, X. S., & Wu, J. H. (2012). Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4179–4185.
- Qi, H., Guan, X., Li, Y., & Jing, P. (2012). Effect of grafting on 2-methyl-1-butyl acetate biosynthesis in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. Makuwa makino) peel and flesh tissues. *Acta Horticulturae*, 932, 271–277.
- Quintás, G., Portillo, N., García-Cañaveras, J. C., Castell, J. V., Ferrer, A., & Lahoz, A. (2012). Chemometric approaches to improve PLSDA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics*, 8, 86–98.
- Ribnicky, D.M., Shulaev, V., & Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 118, 565–572.
- Saftner, R. A., & Lester, G. E. (2009). Sensory and analytical characteristics of a novel hybrid muskmelon fruit intended for the fresh-cut industry. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 327–333.
- Sams, C. E. (1999). Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biology and Technology*, 15, 249–254.
- Savary, G., Guichard, E., Doublier, J. L., & Cayot, N. (2006). Mixture of aroma compounds: Determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Research International*, 39, 372–379.
- Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 139–162.
- Smit, B.A., Engels, W. J. M., & Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: Production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 987–999.
- Song, J., & Forney, C. F. (2007). Flavour volatile production and regulation in fruit. *Canadian Journal of Plant Science*, 88, 537–550.
- Tijssens, L. M. M., Dos-Santos, N., Jowkar, M. M., Obando, J., Moreno, E., Schouten, R. E., et al. (2009). Postharvest fruit firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. *Postharvest Biology and Technology*, 51, 320–326.
- Toivonen, P.M.A., & Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 48, 1–14.
- Vallone, S., Sivertsen, H., Anthon, G. E., Barrett, D.M., Mitcham, E. J., Ebeler, S. E., et al. (2013). An integrated approach for flavour quality evaluation in muskmelon (*Cucumis melo* L. reticulatus group) during ripening. *Food Chemistry*, 139, 171–183.
- Van Moerkercke, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M.A., & Schuurink, R. C. (2009). A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *The Plant Journal*, 60, 292–302.
- Varlet, V., & Fernández, X. (2010). Review. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Science and Technology International*, 16, 463–503.
- Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Ziino, M., Lanza, C. M., & Mazzaglia, A. (2011). Fast quantitative determination of aroma volatile constituents in melon fruits by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 4, 141–149.
- Villanueva, M. J., Tenorio, M.D., Esteban, M.A., & Mendoza, M. C. (2004). Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. *Food Chemistry*, 87, 179–185.
- Whitaker, B.D., & Lester, G. E. (2006). Cloning of phospholipase D- α and lipoxygenase genes CmPLD α 1 and CmLOX1 and their expression in fruit, floral, and vegetative tissues of 'Honey Brew' hybrid honeydew melon. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131, 544–550.
- Wills, D., Stephen, S., & Bryan, E. (2012). *N-Octane pathway map*. (Updated April 20 2012). Univ. Minnesota (http://umbdd.ethz.ch/oct_map.html)
- Zini, E., Biasoli, F., Gasperi, F., Mott, D., Aprea, E., Mark, T. D., et al. (2005). QTL mapping of volatile compounds in ripe apples detected by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Euphytica*, 145, 269–279.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Rambla, J. L., Cabeza, A., Medina, J. J., Sanchez-Sevilla, J. F., Valpuesta, V., et al. (2012). Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of O-methyltransferase FaOMT as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiology*, 159, 851–870.
4. Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A. A., Tadmor, Y., Gepstein, S., Giovannoni, J. J., Katzir, N., & Lewinsohn, E. (2010). Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *The Journal of Experimental Botany*, 61, 1111–1123.
5. Goff, S. A., Klee, H. J. (2006). Plant volatile compounds: Sensory cues for health and nutritional value? *Science*, 311, 815–819.
6. Matich, A., & Rowan, D. (2007). Pathway analysis of branched-chain ester biosynthesis in apple using deuterium labeling and enantioselective gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2727–2735.
7. Pang, X. L., Guo, X. F., Qin, Z. H., Yao, Y. B., Hu, X. S., & Wu, J. H. (2012). Identification of aroma-active compounds in Jiashi muskmelon juice by GC-O-MS and OAV calculation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 4179–4185.
8. Qi, H., Guan, X., Li, Y., & Jing, P. (2012). Effect of grafting on 2-methyl-1-butyl acetate biosynthesis in oriental sweet melon (*Cucumis melo* var. Makuwa makino) peel and flesh tissues. *Acta Horticulturae*, 932, 271–277.
9. Genome Net database resources. <http://www.genome.jp/>. Updated May 20 2013.
10. Wikigenes. Hoffmann, R. (2008). A wiki for the life sciences where authorship matters. *Nature Genetics*, 40, 1047–1051. <http://www.wikigenes.org/e/chem/e/7302.html>.
11. Kunst, L., Jetter, R., & Samuels, A. L. (2006). Biosynthesis and transport of plant cuticular waxes. In M. Riederer, & M. Müller (Eds.). *Annual plant reviews: Biology of the plant cuticle* (pp. 182–215). Oxford, UK: Blackwell.
12. Kniemeyer, O., & Heider, J. (2001). (S)-1-Phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Archives of Microbiology*, 176, 129–135. <http://www.jbc.org/content/276/24/21381.long>
13. Pérez, A. G., & Sanz, C. (2008). Formation of fruit flavor. In B. Bruckner, & S.G. Wyllie (Eds.). *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects* (pp. 43–70). Washington DC: CRC Press.
14. UM-BBD Biodegradation Database. Univ. Minnesota. <http://umbdd.ethz.ch/>. Updated May 27 2013.
15. Wyllie S. G., Leach, D. N., Wang, Y., & Shewfelt, R. L. (1995). Key aroma compounds in melons: Their development and cultivar dependence. In R. L. Rouseff, & M. M., Leahy (Eds.). *Fruit flavors: Biogenesis, characterization, and authentication* (pp. 248–257). Washington, DC: ACS Symposium Series 596; American Chemical Society.
16. Van Moerkercke, A., Schauvinhold, I., Pichersky, E., Haring, M. A., & Schuurink, R. C. (2009). A plant thiolase involved in benzoic acid biosynthesis and volatile benzenoid production. *The Plant Journal*, 60, 292–302.
17. Ribnicky, D. M., Shulaev, V., & Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 118, 565–572.
18. Ott, A., Germond, J. E., & Chaintreau, A. (2000). Vicinal diketone formation in yogurt: C-13 precursors and effect of branched-chain amino acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 724–731.
19. Arfi, K., Landaud, S., & Bonnamy, P. (2006). Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2155–2162.
20. Singh, T. K., Drake, M. A., & Cadwallader, K. R. (2003). Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 139–162.
21. Varlet, X., & Fernández, X. (2010). Review. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Science and Technology International*, 16, 463–503.
22. Gunther, C. S., Heinemann, K., Laing, W. A., Nicolau, L., & Marsh, K. B. (2011). Ethylene-regulated (methylsulfanyl)alkanoate ester biosynthesis is likely to be modulated by precursor availability in *Actinidia chinensis* genotypes. *Journal of Plant Physiology*, 168, 629–638.
23. BIOCYC Database collection. <http://biocyc.org/META/substring-search?type=NIL&object=ISOPROPANOL> (Access 20.06.2013).
24. Leffingwell, J.C. (1999). *Osmanthus*. Leffingwell & Associates. <http://www.leffingwell.com/osmanthus.htm>
25. Wills, D., Stephen, S., & Bryan, E. (2012). N-Octane pathway map. Updated April 20 2013. Univ. Minnesota. http://umbdd.ethz.ch/oct_map.html
26. ChemSink. http://www.chemsink.com/reaction_type/3/ (Access 20.06.2013).
27. The Good Scent Company Database. <http://www.thegoodscentscompany.com>
28. Pherobase. <http://www.pherobase.com/database> (Access 20.06.2013).
29. Tondelier, C., Recherche, A., & Water, V. (2010). Application of the "tastes and odors" investigation tools at Maisons-Laffitte. A T&O case study. Experimental report. Technau 10. November 2010. <http://www.technau.org/fileadmin/files/Publications/Publications/Deliverables/D5.3.11.pdf>
30. Mahattanatawee, K., Perez-Cacho, P. R., Davenport, T., Rouseff, & R. (2007). Comparison of three lychee cultivar odor profiles using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-sulfur detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1939–1944.
31. Flavornet and human odor space. <http://www.flavornet.org/flavornet.html> (Access 20.06.2013).
32. Nattaporn, W., & Pranee, A. (2011). Effect of pectinase on volatile and functional bioactive compounds in the flesh and placenta of 'Sunlady' cantaloupe. *International Food Research Journal*, 18, 819–827.
33. Shabir, G.A., & Bradshaw T. K. (2010). Determination of 1,7,7-Trimethyl bicyclo(2,2,1) heptan-2-one in a cream pharmaceutical formulation by reversed-phase liquid chromatography. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 72, 809–814.
34. Human Metabolome Database Version 3.5. <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB40246.xml?utf8=%E2%9C%93> (Access 20.06.2013).
35. Charles, M., Martin, B., Ginies, C., Etievant, P., Coste, G., & Guichard, E. (2000). Potent aroma compounds of two red wine vinegars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 70–77.

References of tables

1. National Institute of Standards and Technology. NIST database. Updated Feb. 21 2013. <http://www.nist.gov/index.html> (Access 20.06.2013).
2. The IRI and Odour Database. Update May. 27 2013. http://www.odour.org.uk/cgi-bin/view.cgi?Compound_ID=1 (Access 20.06.2013).
3. Smit, B. A., Engels, W. J. M., & Smit, G. (2009). Branched chain aldehydes: Production and breakdown pathways and relevance for flavour in foods. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81, 987–999.

Appendix A. Supplementary Data.

Supplementary Tables.

Suppl. Table 1. Chemical and sensory attributes of the main volatile compounds of Table 4 identified in the near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1, and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) according to the criterion of percentage of variance explained in PLS-DA.

Order ^a	IUPAC ^{a1} name	Compound Class ^b	IDN ^c	RT ^d (min)	LRI Cal ^e	LRI Ref.	Ref.1	Volatile Precursors	Ref.2	Aromatic Notes	Ref.3
1	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	21.598	1189	NR		ACP/EB	14	Not found	
2	Pentane-2,3-dione	KET	22	2.639	698	670	2	AA	18,19	Caramel, sweet, fruity, buttery, fresh; Cream, butter	27, 31
3	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	21.892	1220	1175	1	AA	16,17	Naphthyl, cherry, almond, spice, vanilla	32
4	Unidentified	NID	70	12.376	975	-	-	-		-	
5	Etheryl octadecanoate	NAE	83	20.635	1127	NR		FAs		Not found	
6	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	9.112	916	922	1	GABA	10	Cream, oil, fat, caramel	27, 29
7	1-Phenylethyl acetate	ACE	107	21.731	1197	1186	1	AA	15	Not found	
8	Furan-2-carbaldehyde	ALD	41	5.788	837	838	1	Furan	9	Woody, almond, sweet, fruity, flowery	28
9	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	13.535	996	NR		CH-ol		Not found	
10	Octan-1-ol	ALC	79	18.578	1075	1087	1	FAs	25	Fatty, green, herbal	35
11	Unidentified	NID	104	21.458	1180	-	-	-		-	
12	(2R,3S)-3-Ethylheptan-2-ol	ALC	76	18.870	1078	NR		FAs		Not found	
13	1-Phenylethanone	KET	75	18.304	1070	1070	1	AMS	12	sweet, pungent, hawthorn, mimosa, almond, acacia, Compound; Must,	27, 31

14	Octane-2,5-dione	KET	-	13.069	988	986	1	-		flower, almond
15	2-Methylbenzaldehyde / 4-methylbenzaldehyde	ALD	81	18.688	1076	1067/1081	1	AA	Phe	Warm, mild, floral, sweet, spicy
16	3'-Methylacetophenone/ 2'-Methylacetophenone	KET	95	21.020	1152	1176	1	ACP		Not found
17	Decane	AHA	66	13.920	1003	1000	1	FAs	Saturated fatty acyl chains	Fusel-like, fruity, sweet
18	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	5.355	826	832	1	CAR		Top note of Osmanthus fragrans (sweet osmanthus)
19	S-Methyl ethanethioate	SDC	24	2.688	701	ND	1	AA	Met	Sulfurous, egg, cheese, dairy, vegetable, cabbage

^a Order of the main volatile compounds according to the criterion of the percentage of variance explained in PLS-DA (50%-100%).

^{a1} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; KET, ketones; LAC, lactones; NAE, non-acetate esters; NID, unidentified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of the PLS-DA analysis (Fig.2). IDN with dash (-) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in Fig. 2.

^d RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound.

^e LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6-C20). Abbreviations and acronyms: LRI, linear retention time; LRI Ref., linear retention time referenced (LRI Ref.), literature references for LRI (Ref.1), volatile precursors (Ref.2) or aromatic notes (Ref.3); AA, amino acid; ACP, acetophenone; AMS, alfa-methylstyrene; CAR, carotenoides; CH-ol, cyclohexanol; EB, ethylbenzene; FAs, fatty acids; GABA, gamma-aminobutyrate; Met, L-methionine; NR, not reported in literature search; Phe, L-phenylalanine; Thr, L-threonine; Try, L-tryptophan; Val, L-valine.

Suppl. Table 2. Main volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n=3) and SC7-1 (n=5) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) (n=21). The compounds are arranged according to the Variable importance in the projection (VIP) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Order ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name	Compound		Pedigree			
			Class ^b	IDN ^c	PS	SC10-2	SC7-1	VIP
1	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00	0.14 *	2.34
2	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07 *	0.02	1.98
3	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69 *	0.09	1.90
4	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.05	0.11	0.59 *	1.86
5	000529-20-4 / 000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde / 4-Methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00	0.07 *	1.76
6	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12 *	0.00	1.75
7	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00	0.05 *	1.72
8	003268-49-3	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	0.00	0.04 *	0.03	1.70
9	NID3	Unidentified	NID	91	0.06	0.44	0.38 *	1.70
10	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00	0.43 *	1.59
11	000096-17-3	2-Methylbutanal	ALD	16	0.00	0.07 *	0.01	1.58
12	074367-31-0	(2-Ethyl-3-hydroxy-hexyl) 2-methylpropanoate	NAE	120	2.28	1.04	0.95 *	1.53
13	005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	0.38	0.10 *	0.30	1.51

NIL means followed by an asterisk were significantly different of the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test (P = 0.05). Mass spectra unidentified compound (NID3) reported in Suppl. Table 9 and Suppl. Fig. 4.

^a Order of the main volatile compounds according to criterion VIP.

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; NID, unidentified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2).

Suppl. Table 3. Chemical and sensory attributes of the main volatile compounds of Suppl. Table 1 identified in the near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1, and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) according to the Variable importance in the projection (VIP) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA).

Order ^a	IUPAC ^{al} name	Compound Class ^b	RT ^d		LRI	Volatile				Ref.3		
			IDN ^c	(min)		Cal ^e	LRI Ref.	Ref.1	Precursors		Ref.2	Aromatic Notes
1	Pentane-2,3-dione	KET	22	2.639	698	670	2	AA	Thr/Met	18,19	Caramel, sweet, fruity, buttery, fresh; Cream, butter	27, 31
2	2-Methylpropanal	ALD	7	1.573	ND	552	1	AA	Leu/Val	3	Green, pungent, burnt, malty, toasted, fruity	27
3	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	21.892	1220	1175	1	AA	Phe	16,17	Naphthyl, cherry, almond, spice, vanilla	32
4	Octan-1-ol	ALC	79	18.578	1075	1087	1	Fas		25	Fatty, green, herbal	35
5	2-Methylbenzaldehyde / 4-Methylbenzaldehyde	ALD	81	18.688	1076	1067/1081	1	AA	Phe	16,17	Warm, mild, floral, sweet, spicy	28
6	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	21.598	1189	NR		ACP/EB		14	Not found	
7	3,5,5-trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	5.355	826	832	1	CAR		24	Top note of Osmanthus fragrans (sweet osmanthus)	34
8	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	8.496	905	911	1	AA	Met		Cooked potato	30
9	Unidentified	NID	91	20.879	1143	-	-	-			-	-
10	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	18.870	1078	NR		Fas			Not found	
11	2-Methylbutanal	ALD	16	2.239	653	682	1	AA	Iso	4,5,6,7,8	Green, almond, strong burnt, malty, cocoa	27
12	(2-Ethyl-3-hydroxy-hexyl) 2-methylpropanoate	NAE	120	13.771	1376	1375	1	Fas		25	Not found	
13	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	13.535	996	NR		CH-OI			Not found	

^a Order of the main volatile compounds according to criterion VIP.

^{al}IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ALD, aldehydes; ALC, alcohols; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; NID, unidentified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2).

^d RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound.

^e LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6-C20).

Mass spectra unidentified compound (NID3) reported in Suppl. Table 9 and Suppl. Fig. 4.

Abbreviations and acronyms: LRI, linear retention time; LRI Ref., linear retention time referenced (LRI Ref.), Ref(), literature references for LRI (Ref.1), volatile precursors (Ref.2) or aromatic notes (Ref.3); AA, amino acid; ACP, acetophenone; CAR, carotenoides; CH-Ol, cyclohexanol; EB, ethylbenzene; FAs, fatty acids; Iso, L-isoleucine; Leu, L-leucine; Met, L-methionine; NR, not reported in literature search; Phe, L-phenylalanine; Thr, L-threonine; Val, L-valine.

Suppl. Table 4. Compound classes identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1 of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS). The compounds are arranged according to the Variable importance for projection (VIP) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA).

Compound		
Order^a	Class^b	VIP
1	KET	1.91
2	TER	1.36
3	SDC	1.27
4	ALD	1.12
5	NAE	0.91
6	OTH	0.79
7	AHA	0.47
8	ACE	0.37
9	ACD	0.35
10	ALC	0.14

^a Order of the main volatile compounds according to criterion VIP.

^b Compound classes: ACE, acetate esters; ACD, acids; ALD, aldehydes; ALC, alcohols; ALK, alkanes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; OTH, others; SDC, sulfur-derived compounds; TER, terpenes.

Suppl. Table 5. Compound classes identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs SC10-2 and SC7-1) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS). The compounds are arranged according to the Variable importance measures (VIM) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA).

Compound		
Order^a	Class^b	VIM
1	KET	0.100
2	TER	0.071
3	SDC	0.051
4	ALD	0.048
5	OTH	0.047
6	NAE	0.037
7	ACE	0.025
8	AHA	0.025
9	ACD	0.014
10	ALC	0.007

^a Order of the main volatile compounds according to criterion VIM.

^b Compound classes: ACE, acetate esters; ACD, acids; ALD, aldehydes; ALC, alcohols; ALK, alkanes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; OTH, others; SDC, sulfur-derived compounds; TER, terpenes.

Suppl. Table 6. Presence or absence of volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1 of melon and their presence or absence in the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS). Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Compounds ^a	CAS ^{al} number	IUPAC ^{a2} name	Compound		Pedigree		
			Class ^b	IDN ^c	PS	SC10-2	SC7-1
Not reported in PS/Reported in NIL SC10-2							
1	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69 *	0.09
2	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07 *	0.02
3	003268-49-3	3-Methylsulfonylpropanal	SDC	52	0.00	0.04 *	0.03
4	000096-17-3	2-Methylbutanal	ALD	16	0.00	0.07 *	0.01
5	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethyl(phenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12 *	0.00
6	NIDI	Unidentified	NID	70	0.00	0.32 *	0.00
7	000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	0.00	0.24 *	0.00
8	0096316-89-1	Ethenyl octadecanoate	NAE	83	0.00	0.17 *	0.00
9	000098-01-1	Furan-2-carbaldehyde	ALD	41	0.00	0.03 *	0.00
Not reported in PS/Reported in NIL SC7-1							
1	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00	0.14 *
2	000529-20-4 / 000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde / 4-Methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00	0.07 *
3	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00	0.05 *
Reported in PS/Not reported in NIL SC10-2							
1	000108-21-4	1-Methylethyl acetate	ACE	-	0.05	0.00	0.21 *
2	000123-92-2	3-Methylbutyl acetate	ACE	-	0.02	0.00	0.05
3	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00	0.43 *
4	000124-18-5	Decane	AHA	66	0.15	0.00	0.06
5	001445-91-6	1-Phenylethanol	ALC	-	0.70	0.00 *	0.34
6	028473-21-4	Nonan-1-ol	ALC	-	0.07	0.00	0.10
7	000629-50-5	Tridecane	AHA	-	0.06	0.00	0.01
8	000557-48-2	(2E,6E)-nona-2,6-dienal	ALD	-	0.09	0.00	0.01
9	NR	(E)-4,4-dimethylpent-2-enal	ALD	-	0.03	0.00	0.03
10	018829-56-6	(E)-non-2-enal	ALD	-	0.14	0.00	0.08
11	000098-86-2	1-Phenylethanone	KET	-	1.17	0.00 *	0.41
12	029590-42-9	6-Methylheptyl prop-2-enoate	KET	-	0.04	0.00	0.13
13	000565-69-5	2-Methylpentan-3-one	KET	-	0.07	0.00	0.05

14	025044-01-3	2-Methylpent-1-en-3-one	KET	-	0.03	0.00	0.04
15	057283-79-1	(E)-5-Ethyl-6-methyl-hept-3-en-2-one	KET	-	0.19	0.00	0.21
16	000105-37-3	Ethyl propanoate	NAE	-	0.11	0.00	0.03
17	000093-58-3	Methyl benzoate	NAE	-	0.04	0.00	0.04
18	000492-37-5	2-Phenylpropanoic acid	ACD	-	0.43	0.00 *	0.41
19	001534-08-3	S-methyl ethanethioate	SDC	24	0.05	0.00	0.44 *
Reported in PS/Not reported in NIL SC7-1							
1	000093-92-5	1-phenylethyl acetate	ACE	107	0.01	0.20 *	0.00
2	NID2	Unidentified	NID	104	0.03	0.32 *	0.00
3	019550-05-1	3,4-Dimethylhexan-2-ol	ALC	98	0.01	0.20 *	0.00
4	001565-75-9	2-Phenylbutan-2-ol	ALC	80	0.33	2.27 *	0.00
5	NID4	Unidentified	NID	-	0.01	0.06 *	0.00
Reported in PS/Not reported in both nils (SC10-2, SC7-1)							
1	NID5	Unidentified	NID	-	0.28	0.00	0.00
2	000554-12-1	Methyl propanoate	NAE	-	0.06	0.00	0.00

NIL means followed by an asterisk were significantly different of the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test ($P = 0.05$). The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion.

^a Compounds: Number of volatile compounds for each classification.

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ACD, acids; ACE, acetate esters; AHA, alkanes; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; NID, unidentified; NR, not reported in literature search; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2). IDN with dash (-) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in the Fig. 2.

Suppl. Table 7. Relative abundance in of main ions in probable mass spectra of the unidentified compound NID1 (RT=12.376 min; LRI Cal=975; IDN.70). Relative abundance was calculated in percentage (%) of each peak in relation to abundance of base peak (m/z=71). Base peak is the most abundant peak (999). The mass range is 1 to 999. Mass spectra taken of the NIL SC10-2, replica 1, fruit A.

m/z^a	Abundance	Relative Intensity^b	Relative Abundance (%)
25	25	1	0.02
26	249	12	0.23
27	1574	77	1.46
29	1382	67	1.28
30	3	0	0.00
31	521	25	0.48
32	745	36	0.69
33	23	1	0.02
35	52	3	0.05
36	2	0	0.00
37	31	2	0.03
38	94	5	0.09
39	3036	148	2.81
41	5381	263	4.99
42	2150	105	1.99
43	2997	146	2.78
44	2101	103	1.95
45	322	16	0.30
46	61	3	0.06
47	3	0	0.00
48	42	2	0.04
49	95	5	0.09
50	217	11	0.20
51	384	19	0.36
52	79	4	0.07
53	743	36	0.69
54	543	26	0.50
55	4308	210	3.99
56	1708	83	1.58
57	3591	175	3.33
61	41	2	0.04
62	29	1	0.03
63	134	7	0.12
64	177	9	0.16
65	848	41	0.79
66	175	9	0.16

67	3119	152	2.89
68	1997	97	1.85
69	8433	412	7.82
70	690	34	0.64
71*	20491	999	18.99
72	763	37	0.71
73	88	4	0.08
74	41	2	0.04
75	72	4	0.07
76	34	2	0.03
77	186	9	0.17
79	120	6	0.11
80	259	13	0.24
81	3535	173	3.28
82	2377	116	2.20
83	3705	181	3.43
84	1611	79	1.49
85	749	37	0.69
86	399	19	0.37
87	84	4	0.08
89	22	1	0.02
91	72	4	0.07
93	470	23	0.44
95	15270	745	14.15
96	1346	66	1.25
97	536	26	0.50
98	21	1	0.02
99	670	33	0.62
100	36	2	0.03
103	141	7	0.13
105	127	6	0.12
106	61	3	0.06
107	123	6	0.11
108	96	5	0.09
109	1029	50	0.95
110	4443	217	4.12
111	803	39	0.74

Number followed by an asterisk and highlighted in bold correspond to most abundant peak (base peak). The mass range is 1 to 999.

^a m/z, mass-to-charge ratio.

^b Relative Intensity: Abundances were calculated in relation of the base peak to normalize all mass intensities.

^c Relative Abundance (%): Relative abundance in percentage (%) of each peak in relation of the base peak.

IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2); RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound; LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6-C20).

Suppl. Table 8. Relative abundance of main ions in probable mass spectra of the unidentified compound NID2 (RT=21.458 min; LRI Cal=1180; IDN.104). Relative abundance was calculated in percentage (%) of each peak in relation to abundance of the base peak (m/z=43). Base peak is the most abundant peak (999). The mass range is 1 to 999. Mass spectra taken of the NIL SC10-2, replica 1, fruit B.

m/z^a	Abundance	Relative Intensity^b	Relative Abundance^c (%)
25	36	1	0.01
26	327	7	0.06
27	9717	198	1.92
28	2328	48	0.46
29	12770	261	2.53
30	370	8	0.07
32	1070	22	0.21
33	18	0	0.00
35	10	0	0.00
36	25	1	0.00
36	15	0	0.00
38	286	6	0.06
39	10773	220	2.13
40	2126	43	0.42
41	38304	782	7.58
42	4726	97	0.94
43	48964	999	9.70
44	2133	44	0.42
45	1384	28	0.27
46	2	0	0.00
49	119	2	0.02
50	321	7	0.06
51	902	18	0.18
52	916	19	0.18
53	5682	116	1.13
54	2970	61	0.59
55	28676	586	5.68
56	8040	164	1.59
57	28974	592	5.74
58	47872	978	9.48
59	570	12	0.11
60	152	3	0.03
61	102	2	0.02
62	205	4	0.04
63	367	7	0.07

64	14	0	0.00
65	1577	32	0.31
66	1427	29	0.28
67	15873	324	3.14
68	7959	163	1.58
69	34094	696	6.75
70	5133	105	1.02
71	20136	411	3.99
72	1771	36	0.35
73	576	12	0.11
74	166	3	0.03
75	183	4	0.04
76	169	3	0.03
77	965	20	0.19
78	381	8	0.08
79	3436	70	0.68
80	835	17	0.17
81	23050	471	4.56
82	4405	90	0.87
83	16523	337	3.27
84	8120	166	1.61
85	11379	232	2.25
86	823	17	0.16
87	125	3	0.02
88	100	2	0.02
90	126	3	0.02
91	609	12	0.12
93	570	12	0.11
94	784	16	0.16
95	4696	96	0.93
96	2805	57	0.56
97	4051	83	0.80
98	4694	96	0.93
99	1698	35	0.34
100	73	1	0.01
101	408	8	0.08
102	83	2	0.02
105	983	20	0.19
106	60	1	0.01
107	788	16	0.16
108	319	7	0.06
109	31004	633	6.14
110	4685	96	0.93
111	2033	42	0.40

112	11893	243	2.36
113	5150	105	1.02
114	541	11	0.11
115	234	5	0.05
121	178	4	0.04
122	197	4	0.04
123	5869	120	1.16

Number followed by an asterisk and highlighted in bold correspond to most abundant peak (base peak). The mass range is 1 to 999.

^a m/z, mass-to-charge ratio.

^b Relative Intensity: Abundances were calculated in relation of the base peak to normalize all mass intensities.

^c Relative Abundance (%): Relative abundance in percentage (%) of each peak in relation of the base peak.

IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2); RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound; LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6-C20).

Suppl. Table 9. Relative abundance of main ions in probable mass spectra of the unidentified compound NID3 (RT=20.879 min; LRI Cal=1143; IDN.91). Relative abundance was calculated in percentage (%) of each peak in relation to abundance of the base peak (m/z=57). Base peak is the most abundant peak (999). The mass range is 1 to 999. Mass spectra taken of the NIL SC7-1, replica 2, fruit B.

m/z^a	Abundance	Relative Intensity^b	Relative Abundance^c (%)
30	222	42	0.41
31	128	24	0.24
33	23	4	0.04
34	70	13	0.13
35	23	4	0.04
36	24	5	0.04
39	376	71	0.70
40	291	55	0.54
41	1579	298	2.94
42	219	41	0.41
43	3603	680	6.71
44	663	125	1.24
45	1015	192	1.89
46	33	6	0.06
47	20	4	0.04
48	45	8	0.08
49	32	6	0.06
50	46	9	0.09
52	89	17	0.17
53	537	101	1.00
54	376	71	0.70
55	2080	393	3.88
56	2429	459	4.53
57	5291	999	9.86
58	85	16	0.16
59	219	41	0.41
60	7	1	0.01
61	21	4	0.04
61	213	40	0.40
62	176	33	0.33
63	205	39	0.38
66	458	86	0.85
67	2418	457	4.50
68	1770	334	3.30
69	2480	468	4.62

70	955	180	1.78
71	2699	510	5.03
72	295	56	0.55
73	172	32	0.32
74	168	32	0.31
75	200	38	0.37
77	75	14	0.14
78	444	84	0.83
79	260	49	0.48
80	505	95	0.94
81	1978	373	3.69
82	3487	658	6.50
83	1673	316	3.12
84	991	187	1.85
85	2191	414	4.08
86	151	29	0.28
88	335	63	0.62
89	69	13	0.13
91	238	45	0.44
93	143	27	0.27
94	116	22	0.22
95	1861	351	3.47
96	1941	366	3.62
98	24	5	0.04
99	445	84	0.83
100	160	30	0.30
101	181	34	0.34
102	172	32	0.32
106	19	4	0.04
107	176	33	0.33
108	133	25	0.25
109	4153	784	7.74

Number followed by an asterisk and highlighted in bold correspond to most abundant peak (base peak).

The mass range is 1 to 999.

^a m/z, mass-to-charge ratio.

^b Relative Intensity: Abundances were calculated in relation of the base peak to normalize all mass intensities.

^c Relative Abundance (%): Relative abundance in percentage (%) of each peak in relation of the base peak.

IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2); RT: Mean retention time in minutes for each volatile compound; LRI Cal: Linear retention indices calculated from the RT of a series of straight-chain alkanes (C6-C20).

Suppl. Table 10. Main volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 and SC7-1 of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS). The compounds are arranged according to the Variable importance measures (VIM) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Order ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name	Compound		Pedigree		
			Class ^b	IDN ^c	PS	SC10-2	SC7-1 VIM
1	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00	0.14 *
2	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07 *	0.02 0.0158
3	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.05	0.11	0.59 * 0.0153
4	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69 *	0.09 0.0148
5	000529-20-4 / 000104-87-0	2-Methylbenzaldehyde / 4-Methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00	0.07 * 0.0142
6	NID3	Unidentified	NID	91	0.06	0.44	0.38 * 0.0141
7	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00	0.05 * 0.0139
8	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12 *	0.00 0.0133
9	003268-49-3	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	0.00	0.04 *	0.03 0.0131
10	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00	0.43 * 0.0126
11	074367-31-0	(2-Ethyl-3-hydroxy-hexyl) 2-methylpropanoate	NAE	120	2.28	1.04	0.95 * 0.0124
12	000096-17-3	2-Methylbutanal	ALD	16	0.00	0.07 *	0.01 0.0123

NIL means followed by an asterisk were significantly different of the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test (P = 0.05). The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion. Mass spectra unidentified compound (NID3) reported in Suppl. Table 9 and Suppl. Fig. 4.

^a Order of the main volatile compounds according to criterion VIM.

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; NID, unidentified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2).

Suppl. Table 11. Main volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC7-1 and SC10-2 of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) with absolute loading weights higher than 0.1 in at least one of the two PLS-DA components.

Order ^a	CAS ^b number	PLS-DA1	PLS-DA2
1	000600-14-6*	-0.200	0.239
2	000078-84-2*	-0.195	0.003
3	015764-16-6*	-0.177	-0.122
4	000111-87-5*	-0.168	0.152
5	003268-49-3*	-0.167	-0.031
6	NID3*	-0.164	0.075
9	000529-20-4 / 000104-87-0*	-0.150	0.179
8	000096-17-3*	-0.150	-0.086
7	074367-31-0*	0.150	-0.031
11	002040-07-5*	-0.148	-0.185
10	024156-95-4*	-0.148	0.171
12	004621-04-10	-0.146	-0.004
13	000098-86-2*	0.141	0.068
14	000076-22-2 / 000464-49-3	0.139	0.002
15	000471-01-2	0.135	-0.038
16	005441-52-1*	0.133	0.138
17	019780-39-3*	-0.129	0.187
18	000124-18-5*	0.126	0.100
19	000140-11-4	-0.124	0.147
20	000767-54-4	-0.123	0.035
21	000096-48-0*	-0.121	-0.152
24	0096316-89-1*	-0.120	-0.152
23	000098-01-1	-0.120	-0.149
22	000629-50-5	0.120	-0.002
26	070424-13-4	-0.119	0.060
25	000557-48-2	0.119	-0.015
28	001534-08-3*	-0.118	0.172
27	079637-11-9 / 000629-20-9	0.118	-0.061
30	NID1*	-0.117	-0.183
29	000475-20-7	0.117	0.078
31	000629-59-4	-0.116	0.017
32	000624-16-8	-0.115	0.127
33	000591-23-1	0.114	0.080
35	061193-21-3	-0.113	0.060
34	068411-77-8	0.113	0.021
38	000585-74-0 / 000577-16-2*	0.112	0.134
37	000123-86-4	-0.112	0.083
36	NR1	-0.112	-0.016
39	003214-41-3*	-0.111	0.103
40	000123-73-9	0.105	0.015
41	000093-92-5*	-0.089	-0.150
42	019550-05-1	-0.079	-0.131

43	000617-94-7	0.077	0.110
44	NID2*	-0.074	-0.169
45	009057-02-7	-0.063	-0.106
46	000122-03-2	-0.060	-0.115
47	001565-75-9	-0.056	-0.144
48	000492-37-5	0.052	0.144
49	000110-93-0	0.045	0.117
50	000078-93-3	0.042	0.136
51	000108-21-4	-0.036	0.134
52	074683-66-2	-0.026	0.100
53	000123-92-2	0.025	0.114
54	000079-20-9	0.017	0.106
55	029590-42-9	-0.009	0.110
56	NR2	0.000	0.119

^a Order of the main volatile compounds according to criterion loading weights higher than 0.1 in PLS-DA1. CAS numbers highlighted in bold correspond to volatile compounds with absolute loading weights higher than 0.1 in two PLS-DA components. CAS numbers followed by an asterisk correspond to main volatile compounds identified in the previous PLS-DA analysis (50%-100% variance explained or 0.7-1 distance to the origin in correlation plot, VIP and VIM; Table 4 and Suppl. Tables 1 and 10).

^b CAS, chemical abstracts service.

Abbreviations: NID, unidentified, NR, not reported CAS number in literature search.

Mass spectra unidentified compound (NID1, NID2, NID3) reported in Suppl. Tables 7-9 and Suppl. Figs.2-4.

Suppl. Table 12. Main discriminant volatile compounds identified in the headspace of the fruit of near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n=3) and SC7-1 (n=5) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) (n=21) for all (six) multivariate classifications performed (e and f) and volatile compounds confirmed by one criterion (g). Data are the mean relative content in percentage with respect to the total of the probable aromatic volatile compounds identified.

Compounds per NIL ^a	CAS ^{a1} number	IUPAC ^{a2} name	Compound		Pedigree			p-value ^d	
			Class ^b	IDN ^c	PS	SC10-2	SC7-1		
NIL SC10-2									
1 ^e	002040-07-5	1-(2,4,5-Trimethylphenyl)ethanone	KET	108	0.00	0.12	*	0.00	***
2 ^e	015764-16-6	2,4-Dimethylbenzaldehyde	ALD	115	0.00	0.69	*	0.09	*
3 ^f	000078-84-2	2-Methylpropanal	ALD	7	0.00	0.07	*	0.02	***
4 ^f	000096-48-0	Dihydrofuran-2(3H)-one	LAC	51	0.00	0.24	*	0.00	****
5 ^f	003268-49-3	3-Methylsulfanylpropanal	SDC	52	0.00	0.04	*	0.03	**
6 ^f	005441-52-1	3,5-Dimethylcyclohexan-1-ol	ALC	64	0.38	0.10	*	0.30	****
7 ^f	NID1	Unidentified	NID	70	0.00	0.32	*	0.00	****
1 ^g	000098-86-2	1-Phenylethanone	KET	75	1.17	0.00	*	0.41	*
2 ^g	000076-22-2 / 000464-49-3	1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one / (1R,4R)-1,7,7-Trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-one	ALC	97	0.98	0.63	*	0.73	****
3 ^g	NID2	Unidentified	NID	104	0.03	0.32	*	0.00	**
4 ^g	000093-92-5	1-Phenylethyl acetate	ACE	107	0.01	0.20	*	0.00	**
5 ^g	000064-19-7	Acetic acid	ACD	-	0.11	0.30	*	0.11	NS
Nil sc7-1									
1 ^e	000600-14-6	Pentane-2,3-dione	KET	22	0.00	0.00		0.14	* ****
2 ^e	024156-95-4	3,5,5-Trimethylcyclopent-2-en-1-one	KET	38	0.00	0.00		0.05	* ***
3 ^e	019780-39-3	(2R,3S)-3-ethylheptan-2-ol	ALC	76	0.03	0.00		0.43	* ***
4 ^e	000111-87-5	Octan-1-ol	ALC	79	0.05	0.11		0.59	* ***
5 ^e	000529-20-4 / 000104-87-0	2-methylbenzaldehyde / 4-methylbenzaldehyde	ALD	81	0.00	0.00		0.07	* **
6 ^f	001534-08-3	S-methyl ethanethioate	SDC	24	0.05	0.00		0.44	* **
1 ^g	NID3	Unidentified	NID	91	0.06	0.44		0.38	* *

NIL means followed by an asterisk were significantly different from the control PS according to one-way ANOVA with pedigree effect followed by a Dunnett test (P = 0.05). The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion. Mass spectra unidentified compounds (NID1, NID2, NID3) reported in Suppl. Tables 7-9 and Suppl. Figs. 2-4.

^a Compounds per NIL: Main discriminant volatile compounds for all performed multivariate analysis (e and f) and volatile compounds confirmed by a unique criterion (g).

^{a1} CAS, chemical abstracts service.

^{a2} IUPAC, international union of pure and applied chemistry.

^b Compound classes: ACD, acids; ACE, acetate esters; ALC, alcohols; ALD, aldehydes; KET, ketones; NID, unidentified; SDC, sulfur-derived compounds.

^c IDN: Identification number assigned for each volatile compound in the correlation plot of PLS-DA analysis (Fig.2). IDN with dash (-) means that the compound is into the inner circle of radius 0.5 and the IDN is not represented in the Fig. 2.

^d The raw p values of the ANOVA were corrected for the multiple test using the Benjamini and Hochberg false discovery rate criterion. Original data were transformed for statistical analysis by substituting the zero-values by the minimum value observed and applying the log-transformation (base 2).

^e Discriminant volatile compounds for all performed multivariate analysis classification criteria (six).

^f Discriminant volatile compounds confirmed by at least four of the six classification criteria.

^g Discriminant volatile compounds confirmed by a unique classification criterion.

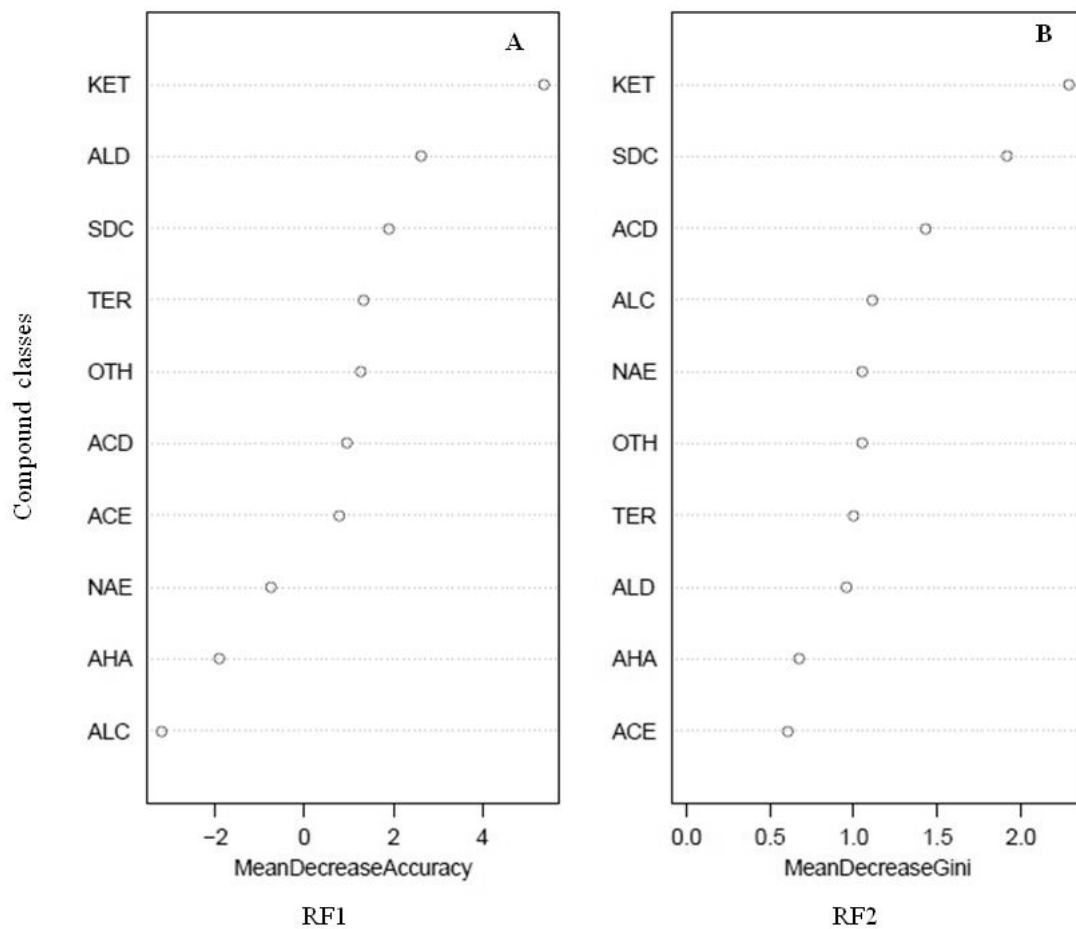
Suppl. Table 13. Confusion matrices of individual volatile compounds for Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) and Random forest (RF) analysis. Data are the number of replicates analyzed in the near-isogenic lines (NILs) SC10-2 (n=3) and SC7-1 (n=5) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS) (n=21).

PLS-DA			
Line	PS	SC10-2	SC7-1
PS	21	0	0
SC10-2	0	3	0
SC7-1	0	0	5
RF			
Line	PS	SC10-2	SC7-1
PS	21	0	0
SC10-2	3	0	0
SC7-1	3	0	2

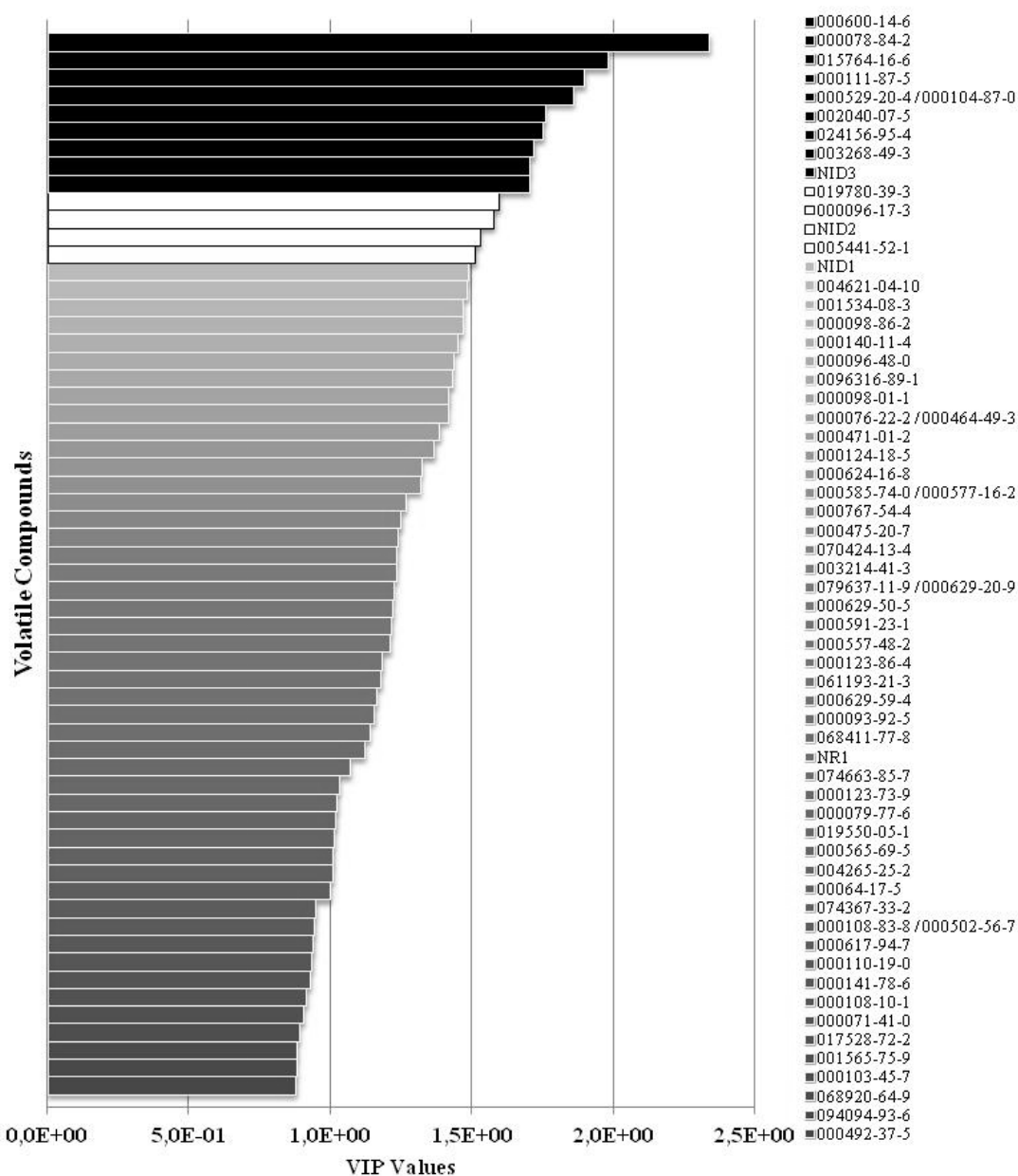
Numbers highlighted in bold correspond to a non correct classification according to confusion matrix of RF.

Supplementary Figures.

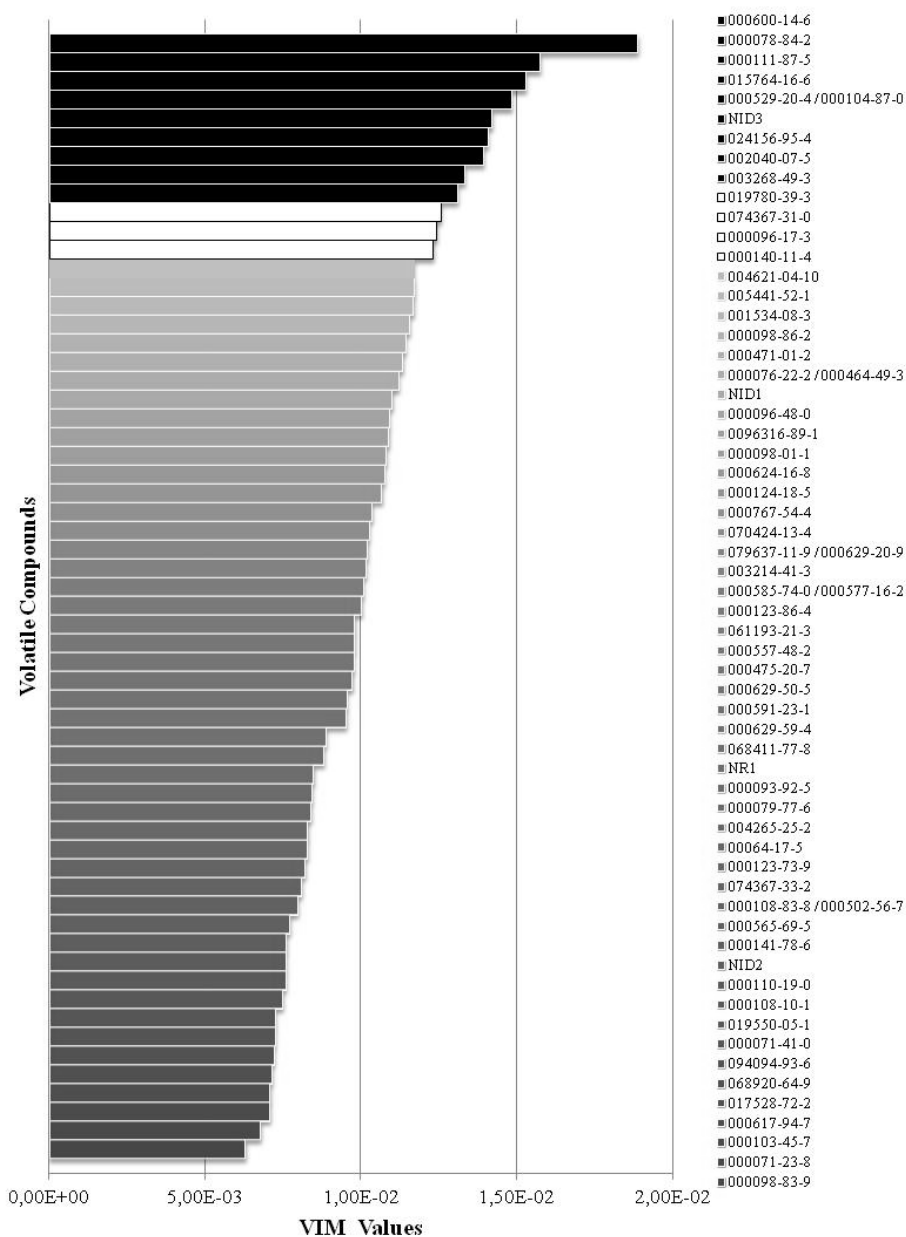
Suppl. Fig. 1. Classification of the ten compound classes according to Random forest (RF) analysis. A. The compound classes listed in axe RF1 based on the mean decreases in accuracy. B. The compound classes listed in axe RF2 based on mean decreases Gini index. Melon fruit compound classes identified in near-isogenic lines (NILs) SC7-1 (○; n=5) and SC10-2 (◆; n=3) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS,●; n=21). ACE, acetate esters; ACD, acids; ALD, aldehydes; ALC, alcohols; ALK, alkanes; KET, ketones; NAE, non-acetate esters; OTH, others; SDC, sulfur-derived compounds; TER, terpenes.



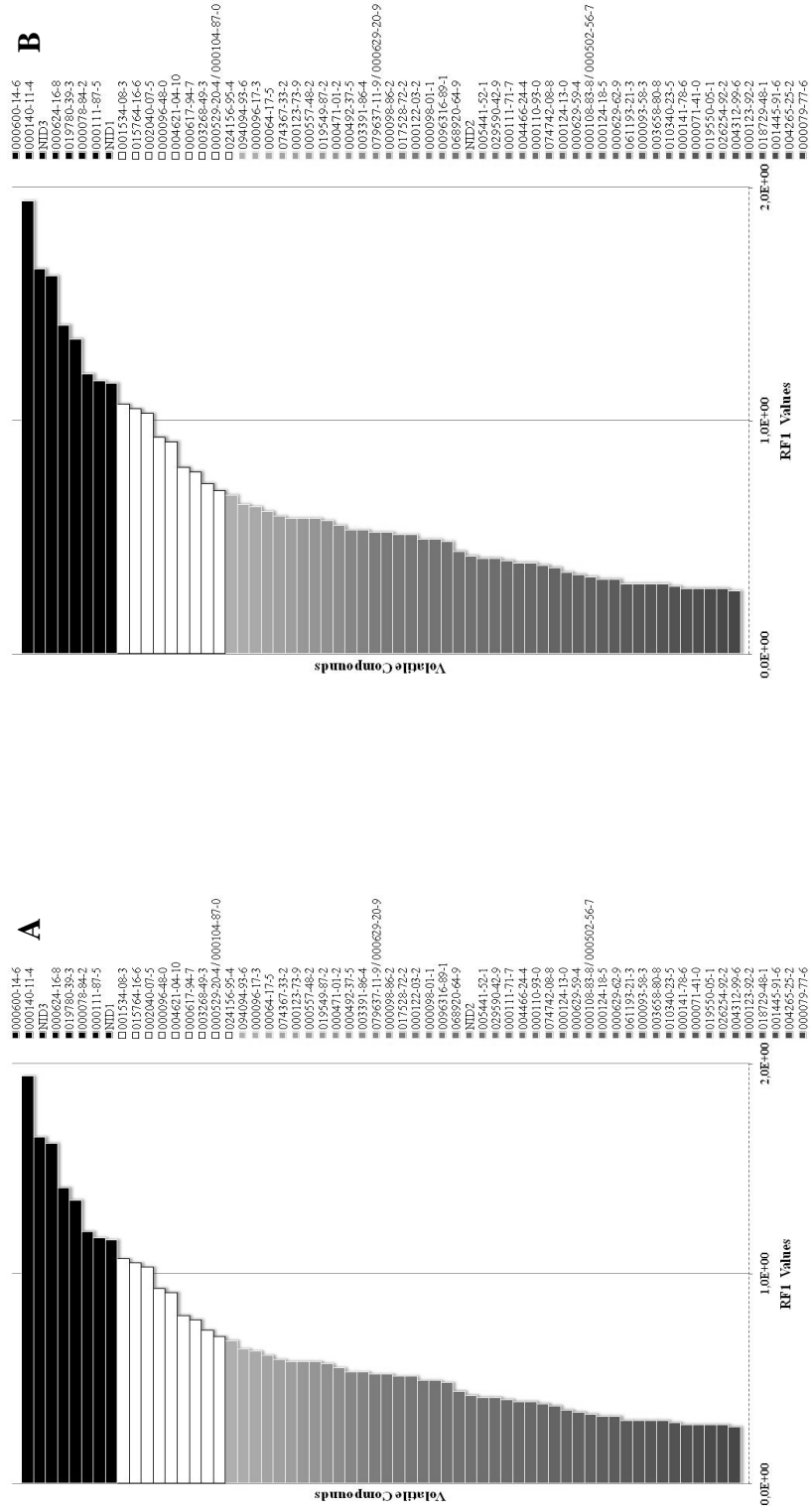
Suppl. Fig. 5. Main discriminant melon aroma volatile compounds (sixty identified with their respective CAS numbers) of the total of 127 compounds identified in the experiment according to the Variable importance in the projection (VIP) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The screen for thirteen volatiles listed were selected based on a change in the slope and above 72% of the maximum value (2.34) for the nine compounds more discriminant (in black) and above 64% of the maximum value for the remaining four compounds (in white). Melon fruit aroma compounds identified in near-isogenic lines (NILs) SC7-1 (○; n=5) and SC10-2 (◆; n=3) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS,●; n=21).



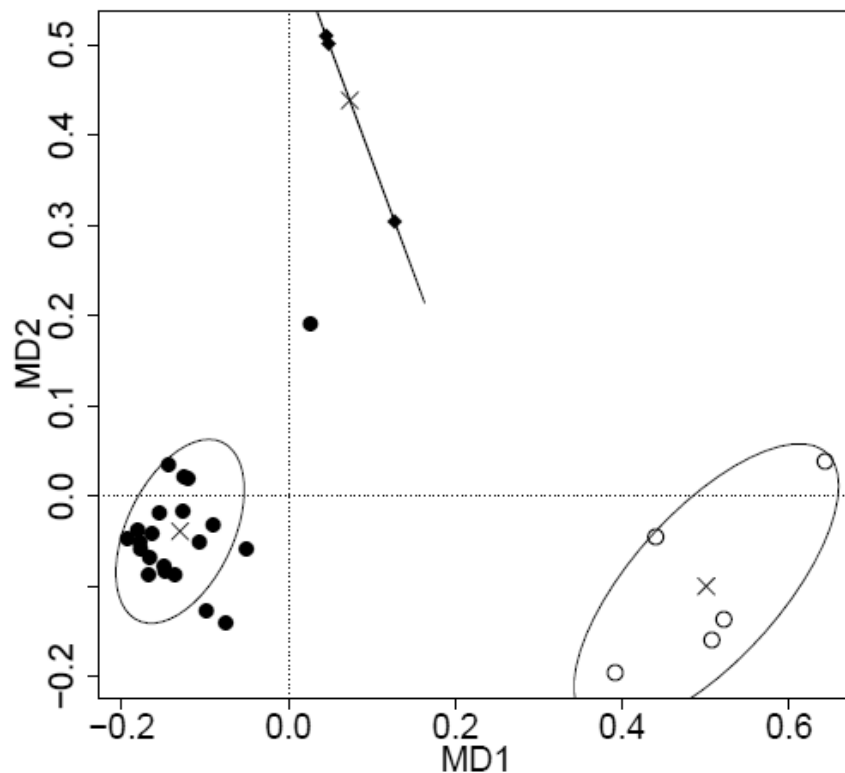
Suppl. Fig. 6. Main discriminant melon aroma volatile compounds (sixty identified with CAS numbers) of the total of 127 identified in the experiment according to the Variable importance measure (VIM) in the Partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA). The screen for twelve volatiles listed were a change in the slope and above 69% of the maximum value (0.0189) for the nine compounds more discriminant (in black) and 65% of the maximum value for the remaining three volatiles (in white). Melon fruit aroma compounds identified in near-isogenic lines (NILs) SC7-1 (○; n=5) and SC10-2 (◆; n=3) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS, ●; n=21).



Suppl. Fig. 7. Main discriminant melon volatile compounds (sixty identified with CAS numbers) according to Random forest (RF) analysis of the total of 127 compounds identified in the experiment. A. The screen for volatiles listed in axe RF1 (17) were selected based on a change in the slope and above 59% of the maximum value (1.94) on the mean decreases in accuracy for the eight volatiles more discriminant (in black) and 35% above of the maximum value for the remaining nine volatiles (in white). B. The screen for volatiles listed in axe RF2 (17) were selected based on a change in the slope and above 66% of the maximum value (0.65) on the mean decreases in Gini index for the six volatiles more discriminant (in black) and 24% above of the maximum value for the remaining nine volatiles (in white). Melon fruit aroma compounds identified in near-isogenic lines (NILs) SC7-1 (○; n=5) and SC10-2 (◆; n=3) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS; ●; n=21).



Suppl. Fig. 8. Discrimination of the near-isogenic lines (NILs) SC7-1 (○; n=5) and SC10-2 (◆; n=3) of melon and the parental line ‘Piel de Sapo’ (PS,●; n=21) using Multidimensional scaling (MDS) plots based on Random forest (RF) analysis applied to the mean relative content in percentage of the probable fruit aromatic volatile compounds identified. Datasets and the corresponding centroids for the different lines and 65% confidence ellipses.



CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN GENERAL

5. DISCUSIÓN GENERAL

La contribución de esta tesis doctoral se resume en el estudio en profundidad de QTLs de textura del fruto y climaterio, así como su incidencia en los aromas del mismo y el mapeo de QTLs de aromas. Ello ha sido posible gracias a la existencia de marcadores moleculares posicionados en mapas genéticos de melón (Díaz et al. 2011; Esteras et al. 2013; Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008, 2010) y a la existencia de líneas casi-isogénicas desarrolladas en proyectos anteriores (Eduardo et al. 2005) y a resultados previos exitosos al respecto. De hecho, la combinación de ambas tecnologías se ha utilizado para mapear QTLs asociados a parámetros de calidad del melón, como contenido de sólidos solubles totales, ácidos orgánicos, azúcares y carotenos, producción de compuestos volátiles, maduración del fruto y papel del etileno, precocidad, peso, forma, tamaño, rendimiento y color del fruto, color de la pulpa, longitud y anchura del ovario, e inclusive se han identificado QTLs para resistencia a virus, hongos y enfermedades (Cuevas et al. 2009; Obando-Ulloa et al. 2008, 2009a; Moreno et al. 2008; Monforte et al. 2004; Park et al. 2009)

En general, utilizando marcadores moleculares y desarrollando nuevas líneas además de las NILs como las RILs (*recombinant inbred lines* o RILs) y otras estrategias de mejora genética (Fernández-Trujillo et al. 2011), más de 160 genes han sido identificados según la lista de genes de melón de 2011 elaborada por investigadores expertos en la materia (Dogimont et al. 2011). Por tanto el uso la selección asistida por marcadores moleculares y la información proporcionada por su mapeo supone una poderosa herramienta para la mejora del cultivo del melón (Harel-Beja et al. 2010; Obando-Ulloa et al. 2008; Park et al. 2009). En este trabajo se añadirían a esa lista un total de más de treinta QTLs relacionados con atributos de calidad como mayor firmeza de la pulpa, producción de aromas volátiles individuales y por grupos y sus metabolismos asociados, así como de la interrelación entre ambos parámetros y su relación con el etileno.

Una de las grandes ventajas del estudio con NILs de melón es que esta especie está dotada de una alta variabilidad molecular, morfológica, fisiológica y composicional en hojas, plantas y frutos, haciendo de esta un gran reservorio genético para la mejora de la calidad de los cultivares de melón (Blanca et al. 2012; Díaz et al. 2011; Nuñez-Palénus et al. 2008; Raghmi et al. 2014). Nuestras NILs han permitido investigar diferentes genotipos de melón y sus diferencias fenotípicas asociadas, principalmente las

vinculadas al comportamiento fisiológico, para ello NILs no climatéricas y climatéricas en diferente grado, con diferencias en textura de pulpa o fruto entero (capítulos 3, 4 y 5), y diferencias de producción aromática (capítulos 3 y 5) fueron evaluadas.

El potencial existente en NILs de melón para el mapeo de QTL lo han demostrado los resultados previos de Obando-Ulloa et al. (2008, 2009a, 2010) y Moreno et al. (2008), donde se han mapeado QTLs asociados a azúcares y ácidos orgánicos (siendo de alto interés los localizados en los LGs III, VIII, IX y X), a la producción de volátiles aromáticos y su relación con el comportamiento fisiológico tanto climatérico (en el LG III) como no climatérico (en los LGs IV, VI y XI), así como a la firmeza de la pulpa (*ff10.2* en el LG X) e incluso relacionando los cambios de firmeza con el fenotipo de maduración climatérica (*ff3.5* en el LG III). Basándose en los mismos, esta tesis ha permitido ampliar el número de QTLs mapeados, especialmente los involucrados en dos de los parámetros más importantes a la hora de definir la calidad del fruto del melón, como son aroma y textura. Para ello se han utilizado NILs con interés por la textura del fruto, pero además por diferentes razones como por ejemplo la pérdida de parte de las plantas por problemas fitosanitarios en campañas anteriores (Eduardo et al. 2007), tuvieron menos oportunidades de caracterización en profundidad como SC7-1, SC7-2 o SC10-2 (Eduardo et al. 2007; Obando et al. 2008, 2010).

1. Comportamiento fisiológico en frutos de melón.

La coexistencia de variedades de melón climatérica y no climatérica hace de este un fruto idóneo para el estudio de la maduración climatérica. Estudios de genómica han revelado que una gran parte de los genes relacionados con la maduración (aproximadamente un 40%) dependen de etileno, siendo este un potenciador que actúa como intermediario de una cadena de reguladores relacionados entre sí (Page et al. 2008). Basado en trabajos iniciales de esta tesis doctoral, Fernández-Trujillo et al. (2008) y Moreno et al. (2008) encontraron un QTL (*eth3.5*) localizado en el LG III de la NIL de melón SC3-5 y otras similares que inducía un fenotipo de maduración climatérica con un incremento tanto de la tasa respiratoria como de los niveles de etileno. En esa misma introgresión fue localizado un gen candidato (*CmACS5*) a ser mapeado y relacionado con la ACC sintasa, enzima clave en la biosíntesis de etileno. Este QTL ha servido como punto de partida importante de la presente tesis y así contribuir a aumentar el conocimiento relativo al papel del etileno en muchos los

procesos madurativos en el fruto del melón. Señalar que paralelamente a las diferencias debidas a la fisiología del fruto, otros factores como el cultivar-dependiente, medioambiental y el manejo del cultivo son importantes en la caracterización de los frutos de melón, como han señalado nuestros resultados con diferentes NILs y en diversas campañas así como trabajos de otros autores (Bernillon et al. 2013; Biais et al. 2011). Por ejemplo, en Dos-Santos et al. 2011, señalamos que en parte las divergencias encontradas entre frutos de la misma línea recolectados en campañas consecutivas, estuvieron motivadas por las diferentes condiciones climáticas y de manejo del cultivo (incluidos problemas fitosanitarios) que acompañaron a cada año. Esto afectó a la recolección de los frutos y por tanto a la idoneidad de su estado de madurez, con frutos algo más inmaduros de lo deseable.

2. Textura, fisiología y composición de la pared celular en frutos de melón.

Definir la calidad de productos hortofrutícolas en términos de atributos internos como la firmeza es bastante complejo, pero posible, y para ello es importante conocer los mecanismos que relacionan la textura de un fruto con respecto a su estado de madurez (Tijskens et al. 2009). Según los resultados de estos autores ciertas NILs de melón de nuestra colección y con distinta dureza del fruto entero sufren un proceso de pérdida de dureza similar, con una tasa constante de ablandamiento independientemente de sus diferencias en la introgresión en el LG III (carácter climatérico o no climatérico). El ablandamiento es un factor determinante en la calidad y vida poscosecha de la fruta (Nishiyama et al. 2007; Prasanna, et al. 2007) estando parcialmente asociado con cambios en los polisacáridos de la pared celular (Dos-Santos et al. 2011). El proceso de ablandamiento solo depende parcialmente del etileno (Flores et al. 2001a), siendo la dureza inicial del fruto entero un valor crítico para controlar la variabilidad en el punto final de senescencia (Tijskens et al. 2009).

Según nuestros resultados la NIL no climatérica SC7-2 tuvo una mayor firmeza de la pulpa que la NIL climatérica SC3-5-1, que tuvo una firmeza similar a PS. Esta mayor firmeza fue asignada al QTL *fh7.2* localizado en el LG VII y asociado a un mayor contenido de ciertos componentes de la pared (especialmente galactosa y residuo de α -celulosa) contribuyendo a la mayor consistencia y menor porosidad de la estructura celular, y limitando la acción enzimática. Una actividad reducida de una pectinmetilesterasa (*CmPME*) ha sido previamente mapeada en el LG VII. Otro QTL

(*eth3.5.*), en este caso relacionado con la síntesis de etileno, fue asociado a la mayor degradación del componente péctico de la pared celular en la NIL SC3-5-1, pudiendo estar implicada una expansina (*CmEXP2*) localizada en el mismo intervalo dicho QTL.

Por ello, para el desarrollo de variedades de melón con mejores características texturales, es importante controlar en la medida de lo posible la variabilidad de los valores de dureza en la recolección, contribuyendo con ello a una mayor estabilidad en la textura de los frutos. Esto será de especial interés en lugares donde factores como la localización y el clima potencian dicha variabilidad (Tijskens et al. 2009).

Junto con la textura, están en boga las investigaciones relativas al aroma y la biosíntesis de los compuestos volátiles característicos de los distintos frutos (Dunemann et al. 2009; Eduardo et al. 2013; Gonda et al. 2010, 2013; Illa et al. 2013; Mathieu et al. 2009; Sánchez et al. 2012, 2013; Vallone et al. 2013; Zorrilla-Fontanesi et al. 2012). En los últimos tiempos se han realizado progresos importantes en la determinación de las vías responsables de las biosíntesis de compuestos volátiles en plantas, siendo el análisis de QTLs uno de los mecanismos que mayores ventajas ha aportado y que más ha contribuido a aumentar el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la producción de compuestos volátiles en las frutas, y que hoy en día siguen siendo en gran parte desconocidos (Zorrilla-Fontanesi et al. 2012).

3. Mapeo de QTLs y caracterización del perfil de aromas del melón.

Numerosos QTLs asociados a la producción de ciertos compuestos volátiles importantes han sido identificados en diferentes especies. La mayoría de estos QTLs fueron mapeados en frutos climatéricos como el tomate (Causse et al. 2008; Klee 2010; Mathieu et al. 2009; Tadmor et al. 2002; Tieman et al. 2006), melocotón (Illa et al. 2011; Eduardo et al. 2013; Sánchez et al. 2012) o manzana (Dunemann et al. 2009), aunque también se han identificado QTLs de interés en frutos no climatéricos como la uva (Battilana et al. 2009; Doligez et al. 2006) o la fresa (Zorrilla-Fontanesi et al. 2012). En este trabajo se ha ampliado de forma importante el número de QTLs mapeado en melón no climatérico, continuando trabajos previos con NILs de melón (Obando-Ulloa et al. 2008, 2010; Fernández-Trujillo et al. 2012, 2013). Hasta un total de treinta dos QTLs han sido mapeados, entre ellos QTLs asociados a una mayor producción de cetonas (en el LG X) y compuestos derivados del azufre (en el LG VII) en general, y otros asociados a compuestos volátiles individuales en particular; como los aldehídos 2-

metilpropanal, 3-furan-2-carbaldehído, 2,2-metilbutanal, 3-metilsulfanilpropanal y 2,4-dimetilbenzaldehído (en el LG X) o compuestos derivados de la metionina como pentano-2,3-diona o S-metil etanotioato (en el LG VII). Sin embargo, la enorme cantidad de compuestos volátiles existentes junto con las dificultades asociadas a su análisis y cuantificación (Vallone et al. 2013; Verzera et al. 2011) hacen que el conocimiento de la relación entre aromas volátiles y el análisis de QTLs sea limitado.

En *Cucumis melo*, los cultivares climatéricos y no climatéricos han sido comparados en numerosos estudios, confirmando junto con lo que mostramos aquí (capítulos 3 y 5), que el carácter distintivo de ésteres (acetato y no acetato) y de compuestos derivados del azufre en frutos climatéricos en un manera dependiente de la maduración, está bien definido (Galaz et al. 2013; Gonda et al. 2010, 2013; Guler et al. 2013; Vallone et al. 2013), mientras que la predominancia de aldehídos y cetonas caracteriza a frutos no climatéricos (Obando-Ulloa et al. 2008, 2009b, 2010). En el capítulo 3 se muestra por ejemplo que un QTL vinculado a la introgresión en el LG III de la NIL SC3.5 y que produjo un climaterio leve en dicha NIL fue asociado a la síntesis de ésteres, y compuestos derivados del azufre.

En Obando-Ulloa et al. (2009b) NILs de melón climatéricas tuvieron un aumento más evidente que las NILs no climatéricas en ciertos compuestos aromáticos durante la senescencia. Sin embargo, la reducción del contenido relativo de ésteres y aldehídos en comparación con los niveles de estos compuestos en la cosecha en dichas NILs no climatéricas apoyaron la hipótesis de una producción de aromas volátiles etileno-independiente en melón

Aldehídos, alcoholes y cetonas fueron los compuestos aromáticos predominantes en PS, NILs y cultivares de referencia no climatéricos siendo aminoácidos y ácidos grasos los principales precursores de este tipo de compuestos. Por otro lado, ésteres, tanto acetato como no acetato obtenidos vía aminoácidos (alanina, valina, leucina, isoleucina, y fenilalanina, principalmente) como compuestos derivados del azufre obtenidos vía metionina, caracterizaron a las NILs y cultivares de referencia climatéricas. Los aminoácidos juegan un papel clave en las síntesis de aromas en melón, estando diferencias en la producción de ésteres relacionadas con diferencias en aminoácidos en variedades ácidas de melón (Lignou et al. 2013). La metionina juega un papel clave en la síntesis de compuestos derivados azufrados en frutos de melón (Varlet y Fernández, 2010; Gonda et al. 2010, 2013).

Nuestros resultados de los capítulos 3 y 5 confirman la fuerte vinculación entre el comportamiento fisiológico de los frutos y la síntesis de compuestos volátiles aromáticos, señalando la dependencia al menos parcial del etileno en la síntesis de ésteres y compuestos derivados de azufre. A su vez, el grado de climaterio (moderado o leve) también influyó en la producción de aromas en las líneas de melón estudiadas. Esto indica que a pesar de la similitud en el comportamiento fisiológico, el efecto del propio cultivar es un factor a tener en cuenta en la generación de los volátiles responsables del aroma. Los resultados de Fernández-Trujillo et al. (2012, 2013a) en frutos de melón intactos de la NIL climática SC3-5-1 (con introgresión en el LG III y VI), ratificaron la etileno-dependencia parcial tanto colectiva como individualmente, de la síntesis de ésteres (principalmente acetato) y de compuestos derivados del azufre.

Por tanto, la presente tesis confirma la hipótesis de partida de una dependencia al menos parcial del etileno en la síntesis de estos ésteres y compuestos derivados del azufre, mientras que aldehídos, cetonas y alcoholes son etileno-independientes.

4. Textura, compuestos volátiles aromáticos y su interrelación.

En el capítulo 5 se ha incidido en ampliar el conocimiento relativo a la correlación existente entre textura y aromas volátiles, así como como su grado de dependencia o independencia del etileno, un trabajo que ha sido abordado con melones con un gen antisentido para la ACC oxidasa en el fondo genético de melón ‘Védrantais’ (Flores et al. 2001ab, 2002). También se ha aportado una revisión acerca de los posibles mecanismos metabólicos involucrados en la síntesis de los compuestos volátiles discriminantes e implicados en diferencias texturales del melón debido a los QTLs en los LGs VII y X. La biosíntesis de aromas junto con los cambios texturales durante la maduración y la senescencia tienen en ciertas frutas cierta correlación debido al efecto matriz de la pared celular, donde la red formada por los polisacáridos puede modificar la pulpa y la viscosidad del zumo (Bezman et al. 2003; Harker y Johnston, 2008; Savary et al. 2006).

En el capítulo 5 la NIL SC10-2 con menor jugosidad de la pulpa también fue la que presentó las mayores diferencias de aromas respecto al control, confirmando parcialmente dicha hipótesis. Alguno de estos volátiles se han revelado como potenciales biomarcadores de las diferencias texturales existente entre el parental PS y las NILs no climáticas SC10-2 y SC7-1, permitiendo además mapear QTLs de aromas

en melones no climatéricos. Veinte QTLs fueron asociados a la mayor firmeza de la pulpa debida a la introgresión en el LG X. Mientras un QTL fue asociado al menor contenido en cetonas, diecinueve QTLs fueron asociados a compuestos volátiles individuales, y principalmente a un mayor contenido en aldehídos derivados de L-aminoácidos (fenilalanina, leucina, valina e isoleucina principalmente), como el 2-metilpropanal, 2-metilpropanal, 2,4-dimetilbenzaldehído y/o furan-2-carbaldehído. La mayor cohesión de la estructura de pared actúa limitando la disponibilidad de los aldehídos como sustratos para la actividad de ciertas enzimas (como pectinmetilesterasas) y su correspondiente conversión en otros compuestos aromáticos. Por otra parte, doce QTLs mapeados en el LG VII y relacionados con un mayor contenido en compuestos azufrados y el metabolismo de la metionina estuvieron asociados a parte a la menor dureza del fruto que produjo la introgresión localizada en el LG VII. Estos resultados servirán de punto de partida para continuar avanzando en la identificación de genes candidatos asociados con aroma y textura de melón de enorme interés para consumidores y mercados.

5. Implicaciones prácticas de la tesis y potenciales aplicaciones.

El conocimiento de los aspectos genéticos involucrados en la mejora de la calidad de frutos, incluido el melón, ha aumentado notablemente en los últimos años. El estudio con NILs de melón ha demostrado su potencial como herramienta para conocer marcadores moleculares asociados a atributos de calidad de este fruto e identificar QTLs asociados al climaterio y la producción de etileno capaces de satisfacer las demandas del consumidor (Fernández-Trujillo et al. 2008; Moreno et al. 2008; Obando-Ulloa et al. 2008, 2009ab). Sin embargo, aún queda mucho por dilucidar en lo referente al conocimiento de la interrelación entre compuestos volátiles y/o textura del fruto del melón, su relación con el etileno y el mapeo de QTLs

Esta tesis ha permitido la identificación de numerosos QTLs de interés para la mejora de calidad del melón, centrándose principalmente en aquellos QTLs vinculados a la síntesis de aromas volátiles, y metabolismos implicados, a la firmeza de la pulpa u otras propiedades texturales e incluso con ambos. Estos QTLs pueden resultar de alto interés, contribuyendo a aumentar el conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan los procesos madurativos de los frutos y al desarrollo de nuevas variedades de

melón con características aromáticas diferentes y/o de mayor firmeza de la pulpa. Esto le da un potencial interés práctico.

De hecho variedades de melón de alto interés económico y de consumo podrán ser desarrolladas; como variedades con mayor poder nutricional debido a su alto contenido en micronutrientes como el ácido ascórbico (Dos-Santos et al. 2009); variedades de mayor acidez, emergentes en el mercado de Reino Unido, debido a un alto contenido en ácido cítrico (Dos-Santos et al. 2007; Lignou et al. 2013); variedades con mayor firmeza de la pulpa (Moreno et al. 2008; Dos-Santos et al. 2011) y/o mayor dureza (Tijssens et al. 2009) encaminadas a satisfacer tanto los gustos de determinados grupos de consumidores como la necesidad de los mercados, debido a su mayor idoneidad que variedades de menor consistencia para el manejo poscosecha y el transporte; variedades más resistentes al daño por frío y/o de larga vida comercial o de utilidad para productos listos para el consumo (Fernández-Trujillo et al. 2008, 2013b); variedades con notas aromáticas características y/o diferentes (Dos-Santos et al. 2013ab; Fernández-Trujillo et al. 2012, 2013a); e inclusive variedades que combinen varias de estas cualidades y que pueden tener un enorme potencial para diversificar el mercado y llegar a cubrir la demanda de una amplia gama de la red consumidores.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales que pueden derivarse de la presente tesis doctoral son las siguientes:

- El distinto comportamiento fisiológico de las líneas de melón estudiadas ha resultado en diferencias en la producción de compuestos volátiles aromáticos tanto cuantitativa como cualitativamente.

- Aldehídos, alcoholes y cetonas (p.ej. butanona o 2-metilpropanal) caracterizaron a las líneas no climatéricas del tipo ‘Piel de Sapo’ (PS y ‘Nicolás’).

- Ésteres (acetato y no acetato) y compuestos derivados del azufre fueron los compuestos mayoritarios en las líneas climatéricas NIL 6M1 (SC3-5-1) y ‘Védrantais’.

- El mayor o menor grado de climaterio (leve o moderado) implicó diferencias en la producción de aromas entre las líneas climatéricas. Ésteres acetato (p.ej. 2-metilbutilacetato) fueron mayoritarios en la NIL con climaterio leve 6M1 mientras que ésteres no acetato (p.ej. metil 2-metilbutanoato) lo fueron en el cultivar con climaterio moderado ‘Védrantais’.

- La síntesis de ésteres (acetato y no acetato) y compuestos derivados del azufre mostró su dependencia al menos parcial del etileno, mientras que aldehídos, alcoholes y cetonas fueron etileno-independientes.

- Los QTLs del LG III relacionados con el climaterio leve en la NIL 6M1 estuvieron relacionados con la síntesis de ésteres (aparente cosegregación al menos parcial).

- NILs de melón con distinta textura, firmeza de la pulpa y comportamiento fisiológico (SC3-5-1 climatérica y SC7-2 no climatérica) y sus parentales no climatéricos (PS y SC) mostraron diferencias en la composición de la pared celular y por tanto dependencia al menos parcial del etileno en el desarrollo de la firmeza de la pulpa de los frutos.

- Los QTLs del climaterio de la NIL climatérica SC3-5-1 estuvieron asociados a una mayor degradación de pectinas.

- La NIL SC7-2 con el QTL que produjo mayor firmeza de la pulpa (*ff7.2*) en el LG VII presentó un mayor contenido de componentes de la pared celular, como la galactosa y residuo de α -celulosa.
- NILs de melón no climatéricas (SC7-1 y especialmente SC10-2) con diferente textura respecto a su parental PS mostraron diferencias en el perfil y la producción de compuestos volátiles aromáticos.
 - Se identificaron un total de treinta y dos QTLs localizados en los LGs VII (doce) y X (veinte) asociados a la producción de ciertos compuestos volátiles fueron identificados como potenciales biomarcadores de las diferencias texturales de las NILs con el parental PS.
 - La mayor firmeza de la pulpa en la NIL SC10-2 estuvo asociada principalmente a una mayor producción de aldehídos (p.ej. 2-metilbutanal), obtenidos vía degradación de L-aminoácidos (fenilalanina, valina, leucina, isoleucina y metionina principalmente).
 - La menor dureza de los frutos enteros en la NIL SC7-1 estuvo asociada a un mayor contenido en compuestos derivados del azufre y compuestos obtenidos vía metabolismo de la metionina.
- En resumen el estudio de NILs de melón ha permitido la localización, identificación y caracterización más detallada del efecto de QTLs en los grupos de LG III, III+VI, VII y X asociados a parámetros de calidad del melón, especialmente aquellos relacionados con climaterio, textura y producción de ciertos compuestos volátiles, así como el uso de parte de estos volátiles como potenciales biomarcadores de parámetros texturales como la firmeza de la pulpa y la dureza del fruto entero de melón.

Literatura Citada

- Aharoni, A., Lewinsohn, E. 2010. Genetic engineering of fruit flavors. En: Hui, Y.H. (Ed.). Handbook of fruit and vegetable flavors. John Wiley & Sons Inc. Hobokon, New Jersey, EE.UU. ch. 7, pp. 101-114.
- Albuquerque, B., Lidón, F.C., Barreiro, M.G. 2006. A case study on the flavor properties of melon (*Cucumis melo* L.) cultivars. *Fruits* 61: 333-339.
- Almeida, D.P.F., Huber, D.J. 1999. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiol. Plant.* 105: 506-512.
- Alsmeirat, N., El Assi, N. M. 2010. Changes in esters, alcohols and acetaldehyde in two cultivars of Charentais melon as influenced by harvest date and storage. *Intl. J. Bot.* 6: 81-88.
- Arfi, K., Landaud, S., Bonnarne, P. 2006. Evidence for distinct L-methionine catabolic pathways in the yeast *Geotrichum candidum* and the bacterium *Brevibacterium linens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2155-2162.
- Arranz, S., Silván, J.M., Saura-Calixto, F. 2010. Nonextractable polyphenols, usually ignored, are the major part of dietary polyphenols: a study on the Spanish diet. *Mol. Nutr. Food Res.* 54: 1646-1658.
- Artés, F., Cano, A., Fernández-Trujillo, J.P. 1996. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. *J. Food Sci.* 61: 311-313, 321.
- Artés, F., Fernández-Trujillo, J.P., Cano, A. 1999. Juice characteristics related to woolliness and ripening during postharvest storage of peaches. *Z. Leb. Forsch. A* 208: 282-288.
- Aubert, C., Bourger, N. 2004. Investigation of volatiles in Charentais cantaloupe melons (*Cucumis melo* var. *cantalupensis*). Characterization of aroma constituents in some cultivars. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4522-4528.
- Ayub, R., Guis, M., Ben Amor, M., Gillot L., Roustan, J.P., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. 1996. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. *Nature Biotechnol.* 14: 862-866.

- Ayub, R., Rombaldi, C., Lucchetta, L., Ginies, C., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C. 2008. Mechanisms of melon fruit ripening and development of sensory quality. En: Pitrat, M. (ed.). Cucurbitaceae 2008. Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of Cucurbitaceae, INRA, Avignon, Francia, Mayo 21-24th, pp. 241-248.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Einstein, M.A., Malundo, T.M.M., Carr, B.T., Shewfelt, R.L., Tandon, K.S. 1998. Relationship between sensory and instrumental analysis for tomato flavor. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 123: 906-915.
- Baldwin, E.A., Scott, J.W., Shewmaker, C.K., Schuch, W., 2000. Flavor trivia and tomato aroma: biochemistry and possible mechanisms for control of important aroma components. *HortScience* 35: 1013-1022.
- Bapat, V.A., Trivedi P.K., Ghosh, A., Sane V.A., Ganapathi, T.R., Nath, P. 2010. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotech. Adv.* 28: 94-107.
- Battilana, J., Costantini, L., Emanuelli, F., Sevini, F., Segala, C., Moser, S., Velasco, R., Versini, G., Grando, M.S. 2009. The 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase gene co-localizes with a major QTL affecting monoterpene content in grapevine. *Theor. Appl. Genet.* 118: 653-669
- Bauchot, D.A., Mottram, D.S., Dodson, A.T., John, P. 1998. Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe *Charentais* melon (cv. Védrentais). *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787-4792.
- Beaulieu, J.C., Grimm, C.C. 2001. Identification of volatile compounds in cantaloupe at various developmental stages using solid phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1345-1352.
- Beaulieu, J.C., Baldwin, E. 2002. Flavor and aroma of fresh-cut fruits and vegetables. Science, technology and market. En: Lamikanra, O. (Ed.). Fresh-cut fruits and vegetables. CRC Press, Londres, Inglaterra. pp. 391-425.
- Beaulieu, J.C., Lea, J.M., Eggleston G. 2003. Sugar and organic acid variations in commercial cantaloupes and their inbred parents. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 5321-536.

- Beaulieu, J.C., Ingram, D.A., Lea, J.M., Bett-Garber, K.L. 2004. Effect of harvest maturity on the sensory characteristics of fresh-cut cantaloupe. *J. Food Sci.* 69: 250-258.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *R. Stat. Soc., Ser. B Stat. Meth.* 57: 289-300.
- Bennett, A.B. 2002. Disassembly in ripening fruit: A general model. *HortScience* 3: 447-449.
- Bennett, A.B., Labavitch, J.M. 2008. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying proteins. *Plant Sci.* 175: 130-136.
- Bernillon, S., Biais, B., Deborde, C., Maucourt, M., Cabasson, C., Gibon, Y., Hansen, T.H., Husted, S., de Vos, R.C.H., Mumm, R., Jonker, H., Ward, J.L., Miller, S.J., Baker, J.M., Burger, J., Tadmor, Y., Beale, M.H., Schjoerring, J.K., Schaffer, A.A., Rolin, D., Hall, D.H., Moing, A. 2013. Metabolomic and elemental profiling of melon fruit quality as affected by genotype and environment. *Metabolomics* 9 (1): 57-77.
- Bezman, Y., Mayer, F., Takeoka, G. R., Buttery, R. G., Ben Oriel, G. Rabinowitch, H.D., Naim, M. 2003. Differential effects of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) matrix on the volatility of important aroma compounds. *J. Agric. Food Chem.* 51: 722-726.
- Biais, B., Allwood, J.W., Deborde, C., Xu, Y., Maucourt, M., Dunn, W.B., Jacob, D., Goodacre, R., Rolin, D., Moing, A., Beauvoit, B. 2009. H NMR, GC-EL-TOFMS, and data set correlation for fruit metabolomics: Application to spatial metabolite analysis in melon. *Anal. Chem.* 81: 2884-2894.
- Bisognin, D.A. 2002. Origin and evolution of cultivated cucurbits. *Ciencia Rural* 32: 715-723. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782002000400028>
- Blanca, J., Esteras, C., Ziarsolo, P., Pérez, D., Fernández-Pedrosa, V., Collado, C., de Pablos, R.R., Ballester, A., Roig, C., Cañizares, J., Picó B. 2012. Transcriptome sequencing for SNP discovery across *Cucumis melo*. *BMC Genom.* 13: 280.
- Botía, P., Navarro, J.M., Cerdá, A., Martínez, V. 2005. Yield and fruit quality of two melon cultivars irrigated with saline water at different stages of development. *Eur. J. Agron.* 23: 243-253.

- Box, G.E.P., Cox, D.R. 1964. An analysis of transformation. *J. R. Stat. Soc. Series B.* 26: 211-252.
- Brownleader, M.D., Jackson, P., Mobasheri, A., Pantelides, A.T., Sumar, S., Trevan, M., Dey, P.M. 1999. Molecular aspects of cell wall modifications during fruit ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 39: 149-164.
- Brummell, D.A., Harpster, M.H. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 47: 311-340.
- Brummell, D.A., Dal Cin, V., Crisosto, C.H., Labavitch, J.M. 2004. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit. *J. Exp. Bot.* 55: 2029-2039.
- Brummell, D.A. 2006. Cell wall disassembly in ripening fruit. *Funct. Plant Biol.* 33: 103-119.
- Burger, Y., Sa'ar, U., Distelfeld, A., Katzir, N., Yeselson, Y., Shen, S., Schaffer, A.A. 2003. Development of sweet melon (*Cucumis melo*) genotypes combining high sucrose and organic acid content. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 128: 537-540.
- Burger, Y., Paris H.S., Cohen R., Katzir, N., Tadmor, Y., Lewinsohn, E. 2010. Genetic diversity of *Cucumis melo*. *Hortic Rev.* 36: 165-198.
- Buscailhon, S., Berdague, J.L., Bousset, J., Cornet, M., Gandemer, G., Touraille, C., Monin, G. 1994. Relations between compositional traits and sensory qualities of french dry-cured ham. *Meat Sci.* 37: 229-243.
- Cantu, D., Vicente, A.R., Greve, L.C., Dewey, F.M., Bennett, A.B., Labavitch, J.M., Powell, A.L.T. 2008. The intersection between cell wall disassembly, ripening, and fruit susceptibility to *Botrytis cinerea*. *PNAS* 105: 859-864.
- Cantwell, M.I., Kasmire, R.F. 2007. Sistemas de manejo postcosecha: Hortalizas de fruto. En: Kader A.A (Ed). Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. University of California, Davis, EE.UU. Series de horticultura postcosecha, 3rd ed., n°24, ch. 30, pp. 457-473.
- Castellanos, M.T., Cartagena, M.C., Ribas, F., Cabello, M.J., Arce, A., Tarquis, A.M. 2010. Efficiency indexes for melon crop optimization. *Agron. J.* 102: 716-722.

- Causse, M., Saliba-Colombani, V., Lesschaeve, I., Buret, M. 2001. Genetic analysis of organoleptic quality in fresh market tomato. 2. Mapping QTLs for sensory attributes. *Theor. Appl. Genet.* 102: 273-283.
- Causse, M., Buret, M., Robini, R., Verschave, P. 2003. Inheritance of nutritional and sensory quality traits in fresh market tomato and relation to consumer preferences. *J. Food Sci.* 68: 2342-2350.
- Causse, M. 2008. Genetic background of flavour: the case of the tomato. En: Brückner, B., Wyllie, S.G (Eds.). *Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. ch.12, pp. 229-253.
- Chaïb, J., Devaux, M-F., Grotte, M-G., Robini, K., Causse, M., Lahaye, M., Marty, I. 2007. Physiological relationships among physical, sensory, and morphological attributes of texture in tomato fruits. *J. Exp. Bot.* 58: 1915-1925.
- Chen, J.F., Staub, J.E., Tashiro, Y., Isshiki, S., Miyazaki, S. 1997. Successful interspecific hybridization between *Cucumis sativus* L. and *C. hystrix* Chakr. *Euphytica* 96: 413-419.
- Cheng, G., Duan, X., Jiang, Y., Sun, J., Yang, S., Yang, B., He, S., Liang, H., Luo Y. 2009. Modification of hemicellulose polysaccharides during ripening of postharvest banana fruit. *Food Chem.* 115: 43-47.
- Cohen, S., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Itkin, M., Portnoy, V., Sa'ar, U., Lev, S., Yeselson, L., Petrikov, M., Rogachev, I., Aharoni, A., Ophir, R., Tadmor, Y., Lewinsohn, E., Burger, Y., Katzir, N., Schaffer, A.A. 2012. Co-mapping studies of QTLs for fruit acidity and candidate genes of organic acid metabolism and proton transport in sweet melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 125: 343-53.
- Cuevas, H.E., Staub, J.E. Simon P.W., Zalapa, J.E. 2009. A consensus linkage map identifies genomic regions controlling fruit maturity and beta-carotene-associated flesh color in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 119: 741-756.

- Dai, N., Cohen, S., Portnoy, V., Tzuri, G., Harel-Beja, R., Pompan-Lotan, M., Carmi, N., Zhang, G., Diber, A., Pollock, S., Karchi, H., Yeselson, Y., Petreikov, M., Shen, S., Sahar, U., Hovav, R., Lewinsohn, E., Tadmor, Y., Granot, D., Ophir, R., Sherman, A., Fei, Z., Giovannoni, J., Burger, Y., Katzir, N., Schaffer, A.A. 2011. *Plant Mol. Biol.* 76: 1-18.
- Dane, F. 1991. Cytogenetics of the genus *Cucumis*. En: Tsuchiya and P.K. Gupta (Eds.). *Chromosome engineering in plants: Genetics, breeding, evolution*, Part B T. Elsevier, Amsterdam, Holanda. pp. 201-214.
- Dávila-Aviña, J.E.D., González-Aguilar, G.A., Ayala-Zavala, J.F., Sepulveda, D.R., Olivas, G.I. 2011. Volatile compounds responsible of tomato flavor. *Rev. Fitotec. Mex.* 34: 133-143.
- De Mello, M.L.S., Bora, P.S., Narain, N. 2001. Fatty and amino acids composition of melon (*Cucumis melo* var. *saccharinus*) seeds. *J. Food Compos. Anal.* 14: 69-74.
- DESCA (Desarrollo Económico Sostenible en Centroamérica). 2010. Melón n°30, Mercado: Unión Europea. https://www.cohep.com/P_Comercial/30-Melon.pdf
- Díaz, A., Fergany, M., Formisano, G., Ziarsolo, P., Blanca, J., Fei, Z., Staub, J.E., Zalapa, J.E., Cuevas, H.E., Dace, G., Oliver, M., Boissot, N., Dogimont, C., Pitrat, M., Hofstede, R., van Koert, P., Harel-Beja R., Tzuri, G., Portnoy V., Cohen, S., Schaffer, A., Katzir, N., Xu, Y., Zhang, H., Fukino, N., Matsumoto, S, Garcia-Mas, J., Monforte, A.J. 2011. A consensus linkage map for molecular markers and quantitative trait loci associated with economically important traits in melon (*Cucumis melo* L.). *BMC Plant. Biol.* 11: 111.
- Dimsey, R.B. 1995. Post harvest handling of melons. *In* Agriculture notes. Department of primary Industries, Victoria, EE.UU. News Letter No. AG0241.
- Dogimont, C., Bordat, D., Pitrat, M., Pages, C. 1995. Characterization of resistance to *Liriomyza trifolii* (Burgess) in melon (*Cucumis melo* L.). *Fruits* 50: 449-452.
- Dogimont, C., Pitrat, M., McCreight, J.D. 2011. Gene list for melon. <http://cuke.hort.ncsu.edu/cgc/cgcgenes/melongenes/genel1melon.html>
- Doligez, A., Audiot, E., Baumes, R., This, P. 2006. QTLs for muscat flavor and monoterpenic odorant content in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Mol. Breed.* 18: 109-125.

- Dos-Santos, N., Obando, J., Ostos, I., Melgarejo, L.M., Moreno, E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2007. Optimización de la extracción de ácidos orgánicos en pulpa liofilizada de melón y análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia. En: Rabasseda, J. Martín de la Hinojosa, M.I. (Coord.). Actas del Quinto Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. V IBEROLAB. Ministerio de Cultura, Pesca y Alimentación (Eds), Madrid, España. pp. 203-211. http://www.iberolab.org/opencms/export/sites/Iberolab/comunicaciones/Comunicaciones/documentos_comunicaciones/Requisitos_Tecnicos_0039.pdf
- Dos-Santos, N., Obando-Ulloa, J.M., García-Mas, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009. Líneas casi-isogénicas de melón aromáticas, climatéricas y con mayor contenido en ácido ascórbico que el tipo no climatérico 'Piel de sapo'. V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos (CYTA 2009). Mediprint (Eds.). Murcia, España, Mayo 26-29 2009. Libro de resúmenes. p.300.
- Dos-Santos, N., Jiménez-Araujo, A., Rodríguez-Arcos, R., Fernández-Trujillo, J.P. 2011. Cell wall polysaccharides of near-isogenic lines of melon and their inbred parentals which show differential flesh firmness and physiological behavior. *J. Agric. Food Chem.* 59: 7773-7784.
- Dos-Santos, N., Bueso, M.C., Fernández-Trujillo, J.P. 2013. Aroma volatiles biomarkers of textural differences at harvest in non-climacteric near-isogenic lines of melon. *Food. Res. Intl.* 54: 1801-1812.
- Dumville, J.C., Fry, S.C. 2000. Uronic-acid oligosaccharins: their biosynthesis, degradation and signalling roles in non-diseased plant tissues. *Plant Physiol. Biochem.* 38: 125-140.
- Dunemann, F., Ulrich, D., Boudichevskaia, A., Grafe, C., Weber, W.E. 2009. QTL mapping of aroma compounds analysed by headspace solid-phase microextraction gas chromatography in the apple progeny 'Discovery' x 'Prima'. *Mol. Breed.* 3: 501-521.
- Eduardo I., Arús P., Monforte A. J. 2005 Development of a genomic library of near isogenic lines (NILs) in melon (*Cucumis melo* L.) from the exotic accession PI 161376 *Theor. Appl. Genet.* 112: 139-148.

- Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A. J., Fernández-Trujillo, J. P., Obando, J., Martínez, J. A., Alarcón, A., Álvarez, J. M., van der Knaap, E. 2007. Estimating the genetic architecture of fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.) using a genomic library of near-isogenic lines. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 132: 80-89.
- Eduardo, I., Chietera, G., Pirona, R., Pacheco, I., Troggio, M., Banchi, E., Bassi, D., Rossini, L., Vecchietti, A., Pozzi, C. 2013. Genetic dissection of aroma volatile compounds from the essential oil of peach fruit: QTL analysis and identification of candidate genes using dense SNP maps. *Tree Genet. Genomes* 9: 189-204
- Ergun, M., Jeong, J., Huber, D.J., Cantliffe, D.J. 2005. Suppression of ripening and softening of 'Galia' melons by 1-methylcyclopropene applied at preripe or ripe stages of development. *HortScience* 40: 170-175.
- Escribano, S., Lázaro, A. 2012. Sensorial characteristics of Spanish traditional melon genotypes: has the flavor of melon changed in the last century? *Eur. Food. Res. Technol.* 234: 581-592.
- Esteras, C., Formisano, G., Roig, C., Díaz, A., Blanca, J., Garcia-Mas, J., Gómez-Guillamón, M.L., López-Sesé, A.I., Lázaro, A., Monforte, A.J., Picó, B. 2013. SNP genotyping in melons: genetic variation, population structure, and linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.* 126: 1285-1303.
- Ezura, H., Owino, W.O. 2008. Melon, an alternative model plant for elucidating fruit ripening. *Plant Sci.* 175: 121-129.
- Fallik, E., Alkali-Tuvia, S., Horev, B., Copel, A., Rodov, V., Aharoni, Y., Ulrich, D., Schulz, H. 2001. Characterisation of 'Galia' melon aroma by GC and mass spectrometric sensor measurements after prolonged storage. *Postharvest Biol. Technol.* 22: 85-91.
- FAO 2010. FAOSTAT agricultural database. <http://apps.fao.org>
- FAO 2013. FAOSTAT agricultural database. <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>
- FECOAM 2012. Valoración Campaña Agrícola Regional 2011/2012. Federación de Cooperativas Agrarias de Murcia (FECOAM). <http://www.agro-alimentarias.coop/ficheros/doc/03796.pdf>

- Fernández-Trujillo, J. P., Obando, J., Martínez, J. A., Alarcón, A., Eduardo, I., Arús P., Monforte, A. J. 2005. Gestión de la calidad de experimentos con frutos de una colección de líneas casi isogénicas de melón. En: Atienza, J., Rabasseda, J. (Coord.). Actas del Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. III IBEROLAB. Madrid, España. pp. 149-158. www.iberolab.org
- Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Martínez, J.A, Moreno, E., García-Mas, J., Monforte, A.J. 2008. Climacteric and non-climacteric behavior in melon fruit 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near-isogenic lines. *Postharvest Biol. Technol.* 50: 125-134.
- Fernández-Trujillo, J.P., Fernández-Talavera, M., Ruiz-León, M., Roca, M.J., Dos-Santos, N. 2010. Aroma volatiles during whole melon ripening in a climacteric near-isogenic line and its inbred non-climacteric parents. *Acta Hort.* (ISHS) 934: 951-958. http://www.actahort.org/books/934/934_127.htm
- Fernández-Trujillo, J.P., Picó, M.B., García-Mas, J., Álvarez, J.M., Monforte, A.J. 2011. Breeding for fruit quality in melon. En: Jenks, M.A., Bebeli, P. (Eds.). Breeding for fruit quality. Wiley-Blackwell (Ed.). Ames, IA, ch. 12, pp. 261-278. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470959350.ch12>.
- Fernández-Trujillo, J.P., Fernández-Talavera, M., Ruiz-León, M.T., Roca, M.J., Dos-Santos, N. 2012. Aroma volatiles during whole melon ripening in a climacteric near-isogenic line and its inbred non-climacteric parents. *Acta Hort.* (ISHS) 934: 951-958.
- Fernández-Trujillo, J.P, Dos-Santos, N., Martínez-Alcaraz, R., Le Bleis, I. 2013a. Non-destructive assessment of aroma volatiles from a climacteric near-isogenic line of melon obtained by headspace sorptive bar extraction. *Foods* 2: 401-414.
- Fernández-Trujillo, J.P., Dos-Santos, N., Bueso, M.C., Esteva, J., Martínez, J.A., Monforte, J.A. 2013b. Melon fresh fruit quality from field to fork: A quality-oriented breeding and multivariate perspective. Symposium Quality of fresh produce, herbs and vegetables-from field to fork. In Quality of fresh produce, herbs and vegetables-from field to fork. Warsaw University of Life Sciences-SGGW. Varsovia, Polonia 18-19 Septiembre 2013. Libro de resúmenes, pp. 39-40.

- Figuerola C.R., Rosli H.G., Civello, P.M., Martínez, G.A., Herrera, R., Moya-León, M.A. 2010. Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria x ananassa* fruits. *Sci. Hort.* 124: 454-462.
- Flavornet and human odor space. <http://www-flavornet-org/flavornet-html>. Actualizada 18 Abril 2013.
- Flores, F., Martínez-Madrid, M.C., Sánchez-Hidalgo, F.J., Romojaro, F. 2001a. Differential rind and pulp ripening of transgenic antisense ACC oxidase melon. *Plant. Physiol. Biochem.* 39: 37-43
- Flores, F., Ben Amor, M., Jones, B., Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A., Romojaro, F. 2001b. The use of ethylene-suppressed lines to assess differential sensitivity to ethylene of the various ripening pathways in Cantaloupe melons. *Physiol. Plant.* 113: 128-133.
- Flores, F., El Yahyaoui, F., Billerbeck, G., Romojaro, F., Latché, A., Bouzayen, M., Pech, J.C., Ambid, C. 2002. Role of ethylene in the biosynthetic pathway of aliphatic ester aroma volatiles in Charentais Cantaloupe melons. *J. Exp. Bot.* 53: 201-206.
- Flores, F.B., Manriquez, D., El-Sharkawy, I., Latché, A., Pech, J.C. 2006. Characterization of genes involved in the formation of aroma volatiles in 'Charentais' melon fruit. *Acta Hort.* (ISHS) 682: 673-679.
- Flores, F., Martínez-Madrid, M. C., Romojaro, F. 2008. Influence of fruit development stage on the physiological response to ethylene in Cantaloupe *Charentais* melon. *Food Sci. Tech. Intl.* 14: 87-94.
- Fuggate, P., Wongs-Aree, C., Kyu, K.L., Kanlayanarat, S., Noichinda, S. 2007. Volatiles during hybrid melon (*Cucumis melo* L. cv. Kuylin) fruit development. *Acta Hort.* (ISHS) 804: 355-362.
- Galaz, S., Morales-Quintana, L., Moya-León, M.A., Herrera, R. 2013. Structural analysis of the alcohol acyltransferase protein family from *Cucumis melo* shows that enzyme activity depends on an essential solvent channel. *The FEBS J.* 280: 1344-57.

- Gao, H.Y., Zhu, B.Z., Zhu, H.L., Zhang, Y.L., Xie, Y.H., Li, Y.C., Luo, Y.B. 2007. Effect of suppression of ethylene biosynthesis on flavor products in tomato fruits. *Russ. J. Plant Physiol.* 54: 80-88.
- García-Ramos, F.J., Valero, C., Homer, I., Ortiz-Cañavate, J., Ruíz-Altisent, M. 2005. Non-destructive fruit firmness sensors: A review. *Span. J. Agric. Res.* 3: 61-73.
- Ghosh, S., Meli, V.S., Kumar, A., Thakur, A., Chakraborty, N., Chakraborty, S., Datta, A. 2011. The N-glycan processing enzymes alpha-mannosidase and beta-D-N-acetylhexosaminidase are involved in ripening-associated softening in the non-climacteric fruits of *capsicum*. *J. Exp. Bot.* 62: 571-582.
- Gil, J.A., Montaña, N., Khan, L., Gamboa, A.J., Narvaez, E.J. 2000. Efecto de diferentes estrategias de riego en el rendimiento y la calidad de dos cultivares de melón (*Cucumis melo* L.) *Bioagro* 12: 25-30.
- Gonda, I., Bar, E., Portnoy, V., Lev, S., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Gepstein, S., Giovannoni, J.J., Katzir, N., Lewinsohn, E. 2010. Branched-chain and aromatic amino acid catabolism into aroma volatiles in *Cucumis melo* L. fruit. *J. Exp. Bot.* 61: 1111-1123.
- Gonda, I., Lev, S., Bar, E., Sikron, N., Portnoy, V., Davidovich-Rikanati, R., Burger, J., Schaffer, A.A., Tadmor, Y., Giovannoni, J.J., Huang, M., Fei, Z., Katzir, N., Fait, A., Lewinsohn, E. 2013. Catabolism of l-methionine in the formation of sulfur and other volatiles in melon (*Cucumis melo* L.) fruit. *The Plant J.* 74: 458-472.
- Gonzalo, M.J., Oliver, M., García-Mas, J., Monfort, A., Dolçet-Sanjuan, R., Katzir, N., Arús, P., Monforte, A. 2005. Simple sequence repeat markers used in merging linkage maps of melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 110: 802-811.
- Goulao, L.F., Oliveira, M.C. 2008. Cell wall modifications during fruit ripening: When a fruit is not the fruit. *Trends Food Sci. Technol.* 19: 4-25.
- Guis, M., Bouquin, T., Zegzouti, H., Ayub, R., Ben Amor, M., Lasserre, E., Botondi, R., Raynal, J., Latché, A., Bouzayen, C., Balagué, C., Pech, J.C. 1997. Differential expression of ACC oxidase genes in melon and physiological characterization of fruit expressing and antisense ACC oxidase. En: Kanellis, A.K. et al. (Eds.). *Biology and biotechnology of the plant hormone ethylene*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Holanda. pp. 327-338.

- Guis, M., Roustan, J.P., Dogimont, C., Pitrat, M., Pech, J.C. 1998. Melon biotechnology. *Biotechnol. Genet. Eng.* 15: 289-311.
- Gunther, C.S., Heinemann, K., Laing, W.A., Nicolau, L., Marsh, K.B. 2011. Ethylene-regulated (methylsulfanyl) alkanolate ester biosynthesis is likely to be modulated by precursor availability in *Actinidia chinensis* genotypes. *J. Plant Physiol.* 168: 629-638.
- Harel-Beja, R., Tzuri, G., Portnoy, V., Lotan-Pompan, M., Lev, S., Cohen, S., Dai, N., Yeselson, L., Meir, A., Libhaber, S.E., Avisar, E., Melame, T., van Koert, P., Verbakel, H., Hofstede, R., Volpin, H., Oliver, M., Fougedoire, A., Stalh, C., Fauve, J., Copes, B., Fei, Z., Giovannoni, J., Ori, N., Lewinsohn, E., Sherman, A., Burger, Y., Tadmor, Y., Schaffer, A.A., Katzir, N. 2010. A genetic map of melon highly enriched with fruit quality QTLs and EST markers, including sugar and carotenoid metabolism genes. *Theor. Appl. Genet.* 121: 511-533.
- Harker, F.R., Stec, M.G.H., Ian, C., Bennett, C.L. 1997. Texture of parenchymatous plant tissue: a comparison between tensile and other instrumental and sensory measurements of tissue strength and juiciness. *Postharvest Biol. Technol.* 11: 63-72.
- Harker, F.R., Lau, K., Gunson, F.A. 2003. Juiciness of fresh fruit: A time intensity study. *Postharvest Biol. Technol.* 29: 55-60.
- Harker, F.R., Johnston, W.L. 2008. Importance of texture in fruit and its interaction with flavour. En: Brückner B., Wyllie, S.G. (Eds.). *Fruit and vegetable flavour. Recent advances and future prospects.* Woodhead Pub. Ltd., Inglaterra, vol. 7, pp. 132-149.
- Harris, P.J., Smith, G.B. 2006. Plant cell walls and cell-wall polysaccharides: structures, properties and uses in food products. *Inter. J. Food Sci. Tech.* 41: 129-143.
- Hiwasa, K., Kinugasa, Y., Amano, S., Hashimoto, A., Nakano, R., Inaba and A., Kubo, Y. 2003. Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit. *J. Exp. Bot.* 54: 771-779.
- Husson F., Josse, J., Le, S., Mazet, J. 2012. FactoMineR: Multivariate exploratory data analysis and data mining with R. R package version.

- Illa, E., Eduardo, I., Audergon, J.M., Barale, F., Dirlewanger, E., Li, X.W., Moing, A., Lambert, P., Le Dantec, L., Gao, Z.S., Poessel, J.L., Pozzi, C., Rossini, L., Vecchietti, A., Arús, P., Howad, W. 2011. Saturating the *Prunus* (stone fruits) genome with candidate genes for fruit quality. *Mol. Breed.* 28: 667-682.
- Immerzeel, P., Eppink, M.M., de Vries, S.C., Schols H.A., Voragen, A.G.J. 2006. Carrot arabinogalactan proteins are interlinked with pectins. *Physiol. Plant.* 128: 18-28.
- Infante, R., Meneses, C., Rubio P., Seibert, E. 2009. Quantitative determination of flesh mealiness in peach [*Prunus persica* L. (Batch.)] through paper absorption of free juice. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 118-121.
- INFO 2012. El sector agroalimentario en la Región de Murcia 2012. Instituto de Fomento de la Región de Murcia. pp. 1-7. http://www.institutofomentomurcia.es/c/document_library/get_file?uuid=adf0feca-8fed-4c94-8b05-f7a677039fe9&groupId=10131.
- Jeong, J., Lee, J., Huber, D.J. 2007. Softening and ripening of 'Athena' cantaloupe (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) fruit at three harvest maturities in response to the ethylene antagonist 1-methylcyclopropene. *Hortscience* 42: 1231-1236.
- Jiménez-Bermúdez, S., Redondo-Nevado, J., Muñoz-Blanco, J., Caballero, J.L., López-Aranda, J.M., Valpuesta, V., Pliego-Alfaro, F., Quesada, M.A., Mercado, J. 2002. A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiol.* 128: 751-759.
- Jones, B., Pech, J.C., Bouzayen, M., Lelièvre, J.M., Guis, M., Romojaro, F., Latché, A. 2001. Ethylene and developmentally-regulated processes in ripening climacteric fruit. *Acta Hort.* (ISHS) 553: 133-139.
- Kader, A.A. 2000. Methods of gas mixing, sampling and analysis. En: Kader, A.A. (Ed.) Postharvest Technology of Horticultural Crops. Publication No. 3311. Division of Agriculture and Natural Resources, University of California, Davis, EE.UU. 3rd ed., pp. 145-148.
- Kader, A.A. 2007. Biología y tecnología postcosecha: Un panorama. En: Ed. Kader A.A. (Ed). Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. University of California, Davis, EE.UU. Series de horticultura postcosecha, 3rd ed., n°24, ch. 4, pp. 43-53.

- Karakurt, Y., Muramatsu, N., Jeong J., Brandon, M., Hurr, B.M., Huber, D.J. 2008. Matrix glycan depolymerisation and xyloglucan endohydrolase activities in ethylene-treated watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit. *J. Sci. Food Agric.* 88: 684-689.
- Kerje, T., Grum, M. 2000. The origin of melon, *Cucumis melo*: a review of the literature. *Acta Hort.* (ISHS) 510: 37-44.
- Klee, H.J. 2010. Improving the flavor of fresh fruits: genomics, biochemistry, and biotechnology. *New Phytol.* 187: 44-56.
- Kourkoutas, D., Elmore, J.S., Mottram, D.S. 2006. Comparison of the volatile compositions and flavour properties of Cantaloupe, Galia and Honeydew muskmelons. *Food Chem.* 97: 95-102.
- Krarup, C., Tohá, J., González, R. 2009. Symptoms and sensitivity to chilling injury of cantaloupe melons during postharvest. *Chilean J. Agric. Res.* 69: 126-133.
- Křístková, E., Lebeda, A., Vinter, V., Blahousek, O. 2003. Genetic resources of the genus *Cucumis* and their morphological description. *Hort. Sci.* (Praga) 30: 14-42.
- Kuhn, M. 2013. Contributions from Wing, J., Weston, S., Williams, A., Keefer, C., Engelhardt, A., Cooper, T. caret: Classification and regression training. R package version 5.15-052. <http://CRAN.R-project.org/package=caret>.
- Kurz, C., Carle, R., Schieber, A. 2008. Characterisation of cell wall polysaccharide profiles of apricots (*Prunus armeniaca* L.), peaches (*Prunus persica* L.), and pumpkins (*Cucurbita* sp.) for the evaluation of fruit product authenticity. *Food Chem.* 106: 421-430.
- Lahaye, M., Quemener, B., Causse, M., Seymour G.B. 2012. Hemicellulose fine structure is affected differently during ripening of tomato lines with contrasted texture. *Intl. J. Biol. Macromol.* 51: 462- 470.
- Laínez, D., Krarup, C. 2008. Caracterización en pre y poscosecha de dos cultivares de melon reticulado del tipo Oriental (*Cucumis melo* Grupo *Cantalupensis*). *Cien. Inv. Agr.* 35: 59-66.

- Lecoq, H., Dafalla, G.A., Mohamed, Y.F., Ali, H.M., Wipf-Scheibel, C., Desbiez, C., Eljack, A.E., Omara, S.K., Pitrat, M. 1994. Survey of virus diseases infecting cucurbit crops in Eastern, Central and Western Sudan. University of Khartoum. *J. Agric. Sci.* 2:67-82.
- Lee, S.K., Kader, A.A. 2000. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin C content of horticultural crops. *Postharvest Biol. Technol.* 20: 207-220.
- Lelièvre, J.M., Ben Amor, M., Flores, F., Gomez, M.C., El-Yahyaoui, F., Chatenet, C., Perin, C., Hernandez, J.A., Romojaro, F., Latché, A., Bouzayen, M., Pitrat, M., Dogimont, C., Pech, J.C. 2000. Ethylene-regulated genes and clarification of the role of ethylene in the regulation of ripening and quality in cantaloupe melon fruit. *Acta Hort.* (ISHS) 510: 499-506.
- Lester, G.E., Burton, B.D. 1986. Relationship of netted muskmelon fruit water loss to postharvest storage life. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 111(5): 727-731.
- Lester, G.E., Crosby K.M. 2002. Ascorbic acid, folic acid and potassium content in postharvest green-flesh Honeydew muskmelon fruit: influence of cultivar, fruit size, soil type and year. *J. Amer. Soc. Hortic. Sci.* 127: 843-847.
- Lester, G.E. 2006a. Environmental regulation of human health nutrients (ascorbic acid, β -carotene, and folic acid) in fruits and vegetables. *HortScience* 41: 3-7.
- Lester, G. 2006b. Consumer preference quality attributes of melon fruits. *Acta Hort.* (ISHS) 712: 175-181.
- Li, X., Cao, S., Zheng, Y., Sun, A. 2011. 1-MCP suppresses ethylene biosynthesis and delays softening of 'Hami' melon during storage at ambient temperature. *J. Sci. Food. Agric.* 91: 2684-2688.
- Li, Z., Yao, L., Yang, Y., Li, A. 2006. Transgenic approach to improve quality traits of melon fruit. *Sci. Hortic.* 108: 268-277.
- Liaw A., Wiener, M. 2002. Classification and regression by randomForest. *R News* 2: 18-22.
- Lignou, S., Parker, J.K., Oruna-Concha, M.J., Mottram, D.S. 2013. Flavour profiles of three novel acidic varieties of muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Food Chem.* 139: 1152-1160.

- Lira, R., Rodríguez-Arévalo, S.I. 1999. Cucurbitaceae A.L. Juss. En: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán 22. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Long, R.L. 2005. Improving fruit soluble solid contents in melon (*Cucumis melo* L.) (reticulates group) in Australian production system. Central Queensland University. <http://www.librayresources.equ.edu.au/thesis/adtQCQU/upload/approved/adtQCQU2005.1019-144749/public/01front.pdf>
- Longhi, S., Moretto, M., Viola, R., Velasco, R., Costa, F. 2012. Comprehensive QTL mapping survey dissects the complex fruit texture physiology in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *J. Exp. Bot.* 63: 1107-1121.
- Lucchetta, L., Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F., Latché, A., Pech, J. 2007a. The role of ethylene in the expression of genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles in melon. En: Ramina, A., Chang, C., Giovannoni, J., Klee, H., Perata, P., Woltering, E. (Eds.). *Advances in Plant Ethylene Research. Proceedings of the 7th international symposium on the plant hormone ethylene*. Springer, Dordrecht, Holanda, ch. 4, pp. 189-196.
- Lucchetta, L., Manrique, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., Ginies, C., Bouzayen, M., Rombaldi, C., Pech, J.C., Latché, A. 2007b. Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference. *J. Agric. Food Chem.* 55: 5213-5220.
- Ma, Y., Hu, X., Chen, J., Chen, F., Wu, J., Zhao, G., Liao, X., Wang, Z. 2007. The effect of freezing modes and frozen storage on aroma, enzyme and micro-organism in Hami melon. *Food Sci. Tech. Intl.* 13: 259-267.
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G., Mignani, I. 2005. Changes in cell wall neutral sugar composition and ethylene evolution as potential indicators of woolliness in cold-stored nectarine fruit. *J. Food Qual.* 28: 407-41.
- Manganaris, G.A., Vasilakakis, M., Diamantidis, G., Mignani, I. 2006. Diverse metabolism of cell wall components of melting and non-melting peach genotypes during ripening after harvest or cold storage. *J. Sci. Food Agric.* 86: 243-250.

- Manrique, G.D., Lajolo, F.M. 2004. Cell-wall polysaccharide modifications during postharvest ripening of papaya fruit (*Carica papaya*). *Postharvest Biol. Technol.* 33: 11-26.
- Manríquez, D., El-Sharkawy, I., Flores, F.B., El-Yahyaoui, F., Regad, F., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C. 2006. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics. *Plant Mol. Biol.* 61: 675-686
- MARM. 2010. Avances de superficie y producciones agrícolas. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. <http://www.mapa.es/es/estadistica/pags/superficie/superficie.htm>
- Maroto, J.V. 1994. El cultivo de las cucurbitáceas en España. En: Díaz Ruiz, J.R., García-Jiménez, J. (Eds.). *Enfermedades de las cucurbitáceas en España*. Sociedad Española de Fitopatología: Agripubli, S.L. (Phytoma, España).
- Maroto, J.V. 1995. *Horticultura herbácea especial*. 4ª Ed. Madrid, España, Mundi-Prensa.
- Maroto, J.V. 1997. Calendarios de producción en melón. En: Namesny, A. (Coord.). *Melones*. Ediciones de Horticultura, Reus, Tarragona, España. pp. 51-57.
- Martínez-Romero, D., Bailén, G., Serrano, M., Guillén, F., Valverde, J.M., Zapata, P., Castillo, S., Valero, D. 2007. Tools to maintain postharvest fruit and vegetable quality through the inhibition of ethylene action: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47: 543-560.
- Mathieu, S., Dal Cin, V., Fei, Z., Li, H., Bliss, P., Taylor, M.G., Klee, H.J., Tieman, D.M. 2009. Flavour compounds in tomato fruits: Identification of loci and potential pathways affecting volatile composition. *J. Exp. Bot.* 60: 325-337.
- Mbéguié-A-Mbéguié, D., Hubert O., Baurens, F.C., Matsumoto, T., Chillet, M.B. Fils-Lycaon, B., Sidibé-Bocs, S. 2009. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *J. Exp. Bot.* 60: 2021-203.
- McCreight, J.D., H. Nerson, R. Grumet. 1993. Melon *Cucumis melo* L. En: Kalloo, G., Berch B.O. (Eds.). *Genetic improvement of vegetable crops*. Pergamon Press, Oxford, Inglaterra. pp. 267-294.

- Meli, V.S., Ghosh, S., Prabha, T.N., Chakraborty, N., Chakraborty, S., Datta A. 2010. Enhancement of fruit shelf life by suppressing N-glycan processing enzymes. *PNAS* 107: 2413-2418.
- Mendoza, S.F., Vargas, J.A., Moreno, A.L. 2000. Producción de melón (*Cucumis melo* L.) mediante acolchado plástico y riego por cintilla. *Revista Chapingo Serie Zona Áridas* 1: 115-123.
- Menezes, J.B., Chitarra, A.B., Chitarra, M.I.F., Bicalho, U.O. 1997. Modifications of the cell wall components in Galia melons during ripening. *Ciencia Tecnol. Aliment.* 17: 301-308.
- Molina-Delgado, D., Alegre, S., Puy, J., Recasens, I. 2009. Relationship between acoustic firmness and Magness Taylor firmness in Royal Gala and Golden Smoothee apples. *Food Sci. Tech. Intl.* 15: 31-40.
- Monforte, A.J., Eduardo, I., Arús, P. 2002. Desarrollo de una librería genómica de líneas casi isogénicas en melón. Progreso actual y perspectivas. *Actas Hort.* (SECH) 34: 577-582.
- Monforte, A.J., Oliver, M., Gonzalo, M.J., Alvarez, J.M., Dolcet-Sanjuan, R., Arús, P. 2004. Identification of quantitative trait loci involved in fruit quality traits in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 108: 750-758.
- Monforte, J.A., Álvarez, J.M. 2006. Mejora de la calidad del melón. En *Mejora genética de la calidad en plantas*. En: Llácer, G., Díez, M.J., Carrillo, J.M., Badenes, M.L. (Eds.). Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España, cap. 16, pp. 394-413.
- Moreno, E., Obando, J., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García-Mas, J. 2008. Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon. *Theor. Appl. Genet.* 116: 589-602.
- Muriel, E., Antequera, T., Petró, M.J., Andrés, A.I., Ruiz, J. 2004. Volatile compounds in Iberian dry-cured loin. *Meat Sci.* 68: 391-400.
- Nara, K., Kato, Y., Motomura, Y. 2001. Involvement of terminal-arabinose and galactose pectic compounds in mealiness of apple fruit during storage. *Postharvest Biol. Technol.* 22: 141-150.
- National Institute of Standards and Technology. NIST database. Actualizado Feb. 21 2013.

- Nee, M. 1993. Cucurbitaceae A.L. Juss. *En Flora de Veracruz*, 74. Instituto de Ecología A.C. y Universidad de California, Riverside. Xalapa, Ver.
- Negi, P., Handa, A. 2008. Structural deterioration of the produce: the breakdown of cell wall components. En: Paliyath, G., Murr, D. P., Handa, A. K., Lurie, S. (Eds.). *Postharvest biology and technology of fruits: vegetables and flowers*. Wiley-Blackwell. EE.UU. vol. 8, pp. 163-194.
- Nesom, G.L. 2011. Toward consistency of taxonomic rank in wild/domesticated Cucurbitaceae. *Phytoneuron* 13: 1-33.
- Nishiyama, Y., Langan, P., Chanzy, H. 2002. Crystal structure and hydrogen-bonding system in cellulose Ib from synchrotron X-ray and neutron fiber diffraction. *J. Amer. Chem. Soc.* 124: 9074-9082.
- Nishiyama, K., Guis, M., Rose, J.K.C., Kubo, Y., Bennett, K.A., Wangjin, L., Kato, K., Ushijima, K., Nakano, R., Inab, A., Bouzayen, M., Latché, A., Pech, J.C., Bennett, A.B. 2007. Ethylene regulation of fruit softening and cell disassembly in Charentais melon. *J. Exp. Bot.* 58: 1281-1290
- Nishizawa, T., Okafuji, K., Murayama, H. 2009. Storability and development of physiological disorder of netted melon 'life' fruit as influenced by storage conditions. *Acta Hort.* (ISHS) 837: 147-154.
- Núñez-Palenius, H.G., Gomez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G., Cantliffe, D.J. 2008. Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 13-55
- Obando, J., Miranda, C., Jowkar, M.M., Moreno, E., Souri, M.K., Martínez, J.A., Arús, P., García-Mas, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2007. Creating climacteric melon fruit from nonclimacteric parentals: Postharvest quality implications. En: Ramina, A., Chang, J., Giovannoni, J., Klee, H., Perata, P., Woltering, E. (Eds.). *Advances in Plant Ethylene Research. Proceedings of the 7th International Symposium on the Plant Hormone Ethylene*. Kluwer Academia Pub. Group (Ed.), Dordrecht, Holanda, pp. 197-205.
- Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Alarcón, A.L., Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A. J. 2008. Identification of quantitative trait loci of melon fruit quality traits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 133: 139-151.

- Obando-Ulloa, J.M., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2008. Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit. 1. Aroma volatiles. *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.
- Obando-Ulloa, J.M., Eduardo, I., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009a. Identification of QTLs related to sugar and organic acid composition in melon using near-isogenic lines. *Sci. Hort.* 121: 425-433.
- Obando-Ulloa, J.M., Nicolai, B., Lammertyn, J., Bueso, M.C., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009b. Aroma volatiles associated with the senescence of climacteric or non-climacteric melon fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 52: 146-156.
- Obando-Ulloa, J.M., Jowkar, M.M., Moreno, E., Souiri, M.K., Martínez, J.A., Bueso, M.C., Monforte A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009c. Discrimination of climacteric and non-climacteric fruit at harvest and at senescence stage by quality traits. *J. Sci. Food Agric.* 89: 1743-1753.
- Obando-Ulloa, J.M., Ruiz, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2010. Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon. *Food Chem.* 118: 815-822.
- Orfila, C., Huisman, M M.H., Willats, W.G.T., van Alebeek, G.-J.W.M., Schols, H.A., Seymour, G.B., Knox, P.J. 2002. Altered cell wall disassembly during ripening of Cnr tomato fruit: implications for cell adhesion and fruit softening. *Planta* 215: 440-447.
- Ott, A., Germond, J.E., Chaintreau, A. 2000. Vicinal diketone formation in yogurt: C-13 precursors and effect of branched-chain amino acids. *J. Agric. Food Chem.* 48: 724-731.
- Page, D., Marty, I., Bouchet, J.P., Gouble, B., Causse, M. 2008. Isolation of genes potentially related to fruit quality by subtractive selective hybridization in tomato. *Postharvest Biol. Technol.* 50:117-124.
- Park, S.O., Hwang, H.Y., Crosby, K.M. 2009. A genetic linkage map including loci for male sterility, sugars, and ascorbic acid in melon. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 134 (1): 67-76.

- Pech, J.C., El-Yahyaoui, F.E, Bernadac, A., Latché, A., Billerbeck, G.D., Ambid, C., Flores, B., Romojaro, F., Bower, J., Holford, P. 2002. Role of ethylene on various ripening pathways and on the development of sensory quality of *Charentais* cantaloupe melons. *Acta Hort.* (ISHS) 588: 303-308.
- Pech, J.C., Bouzayen, M., Latché, A. 2008a. Climacteric fruit ripening: Ethylene-dependent and independent regulation of ripening pathways in melon fruit. *Plant Sci.* 75: 114-120.
- Pech, J.C., Latché, A., Van der Rest, B. 2008b. Genes involved in the biosynthesis of aroma volatiles and biotechnological applications. *In* Fruit and vegetable flavour: recent advances and future prospects. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, Inglaterra. pp. 254-271.
- Peña, M.J., Carpita, N.C. 2004. Loss of highly branched arabinans and debranching of rhamnogalacturonan I accompany loss of firm texture and cell separation during prolonged storage of apple. *Plant Physiol.* 135: 1305-1313.
- Pérez, A.G., Sanz, C. 2008. Formation of fruit flavour. En: Brückner, B., Wyllie, S.G. Woodhead (Eds.). Fruit and vegetable flavour: Recent advances and future prospects. Publishing Limited, Cambridge, Inglaterra. ch. 4, pp. 41-70.
- Pérez-Almeida, I., Carpita, N.C. 2006. The β -galactosidases and the dynamics of cell wall. *Interciencia* 31: 476-483.
- Pherobase. <http://www.pherobase.com/database>. Acceso Junio 2013.
- Pitrat, M. 2008. Melon (*Cucumis melo* L.). En: Prohens, J., Nuez, F (Eds.). Handbook of crop breeding vegetables. Springer, NY, EE.UU. vol. 1, pp. 283-315.
- Posé, S., Paniagua, C., Cifuentes, M., Blanco-Portales, R., Quesada, M.A., Mercado, J.A. 2013. Insights into the effects of polygalacturonase *FaPG1* gene silencing on pectin matrix disassembly, enhanced tissue integrity, and firmness in ripe strawberry fruits. *J. Exp. Bot.* 64: 3803-3815.
- Prasanna, V., Prabha, T.N., Tharanathan, R.N. 2007. Fruit ripening phenomena-An overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 47: 1-19.

- PROEXPORT 2009. Asociación de Productores-Exportadores de Frutas y Hortalizas de la Región de Murcia. Sembrando Futuro. La Región de Murcia reduce un 10% las hectáreas de melón en 2009. nº41, pp. 1-3. www.proexport.es/.../2009515112933BOLETIN_PROEXPORT_Nº_41.pdf
- Quintás, G., Portillo, N., García-Cañaveras, J.C., Castell, J.V., Ferrer, A., Lahoz, A. 2012. Chemometric approaches to improve PLSDA model outcome for predicting human non-alcoholic fatty liver disease using UPLC-MS as a metabolic profiling tool. *Metabolomics* 8: 86-98.
- Raffo, A., Nardo, N., Tabilio, M.R., Paoletti, F. 2008. Effects of cold storage on aroma compounds of white- and yellow-fleshed peaches. *Europ. Food Res. Technol.* 226: 1503-1512.
- Raghami, M., López-Sesé, A.I., Hasandokht, M.R., Zamani, Z., Moghadam, M.R.F., Kashi, A. 2014. Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. *Plant. Syst. Evol.* 300: 139-151.
- Rashid, M.A., Singh, D.P. 2000. A Manual on vegetable seed production in Bangladesh. AVRDC-USAID--Bangladesh Project, Horticulture Research Centre, Bangladesh Agricultural Research Institute, Joydebpur, Gazipur, Bangladesh. ch.1, pp.1-4.
- Ratnayake, R.M.S., Melton, L.D., Hurst P.L. 2003. Influence of cultivar, cooking, and storage on cell-wall polysaccharide composition of winter squash (*Cucurbita maxima*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 1904-1913.
- Reid, M.S. 2007. El Etileno en la tecnología postcosecha. En: Kader A.A. (Ed.). Tecnología postcosecha de cultivos hortofrutícolas. University of California, Davis, EE.UU. Series de horticultura postcosecha, 3rd ed. nº 24, ch. 16, pp. 175-190.
- Reyes-Carrillo, J.L., Cano-Ríos, P., Nava-Camberos, U. 2009. Optimum pollination period in the muskemelon with honey bees (*Apis mellifera* L.). *Agric. Tec. Mex.* 35: 70-377.
- Ribas, F., Cabello, M.J., Moreno, M.M., López-Bellido, L. 2000. Respuesta fisiológica de un cultivo de melón (*Cucumis melo* L.) a distintas dosis de riego. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.* 15: 197-212.

- Robinson, R., Decker-Walters, D.S. 1997. Cucurbits. CAB International. Wallingford, Inglaterra.
- Robinson, R., Decker-Walters, D.S. 1999. Cucurbits. CAB International. New York, EE.UU.
- Rodríguez, R., Jaramillo, S., Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., Fernández-Bolaños, J. 2004. Mechanical properties of white and green asparagus: changes related to modifications of cell wall components. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1478-1486.
- Rojas, A.M., Castro, M.A., Alzamora, S.M., Gerschenson L.N. 2001. Turgor pressure effects on textural behaviour of honeydew melon. *J. Food Sci.* 66: 111-117.
- Rose, J.K.C., Hadfield, K.A., Labavitch, J.M., Bennett, A.B. 1998. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol.* 117: 345-361.
- Rowan, D.D., Hunt, M.B., Alspach, P.A., Whitworth, C.J., Oraguzie, N.C. 2009. Heritability and genetic and phenotypic correlations of apple (*Malus x domestica*) fruit volatiles in a genetically diverse breeding population. *J. Agric. Food Chem.* 57: 7944-7952.
- Rugkonga, A., Rose, J.K.C., Leeb, S.J., Giovannoni, J.J., O'Neill, M.A., Watkins, C.B. 2010. Cell wall metabolism in cold-stored tomato fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 57: 106-113.
- Saftner, R., Abbott, J.A., Lester, G., Vinyard, B. 2006. Sensory and analytical comparison of orange-fleshed honey dew to cantaloupe and green-fleshed honeydew for fresh-cut chunks. *Postharvest Biol. Technol.* 42: 156-160.
- Saladié, M., Matas, A.J., Isaacson, T., Jenks, M.A., Goodwin, S. M., Niklas, K.J., Xiaolin, R., Labavitch, J.M., Shackel, K.A., Fernie, A.R., Lytovchenko, A., O'Neill, M.A., Watkins, C.B., Rose, J.K.C. 2007. Reevaluation of the key factors that influence tomato fruit softening and integrity. *Plant Physiol.* 144: 1012-1028.
- Salentijn, E.M.J., Aharoni, A., Schaart, J.G., Boone, M.J., Krens, F.A. 2003. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit-firmness. *Physiol. Plant.* 118: 571-578.
- Sams, C.E. 1999. Preharvest factors affecting postharvest texture. *Postharvest Biol. Technol.* 15: 249-254.

- Sánchez, G., Besada, C., Badenes, M.L., Monforte, A.J., Granell A. 2012. A non-targeted approach unravels the volatile network in peach fruit. *PLoS One* 7(6): e38992.
- Sánchez, G., Venegas-Calderón, M., Salas, J.J., Monforte, A., Badenes, M.L., Granell, A. 2013. An integrative “omics” approach identifies new candidate genes to impact aroma volatiles in peach fruit. *BMC Genomics* 14: 343.
- Savary, G., Guichard, E., Doublier, J.L., Cayot, N. 2006. Mixture of aroma compounds: Determination of partition coefficients in complex semi-solid matrices. *Food Res. Intl.* 39: 372-379.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., Lewinsohn, E. 2008. Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *Plant J.* 54: 712-732.
- Shalit, M., Katzir, N., Tadmor, Y., Larkov, O., Burger, Y., Shalekhet, F., Lastochkin, E., Ravid, U., Amar, O., Edelstein, M., Karchi, Z., Lewinsohn, E. 2001. Acetyl-CoA: alcohol acetyltransferase activity and aroma formation in ripening melon fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 794-799.
- Shiomi, S., Yamamoto, M., Nakamura, R., Inaba, A. 1999. Expression of ACC synthase and ACC oxidase genes in melons harvested at different stage of maturity. *J. Jpn. Soc. Hortic. Sci.* 68: 10-17.
- Simandjuntak, V., Barrett, D.M., Wrolstad, R.E. 1996. Cultivar and maturity effects on muskmelon (*Cucumis melo*) colour, texture and cell wall polysaccharide composition. *J. Sci. Food Agric.* 71: 282-290.
- Singh T.K., Drake, M.A., Cadwallader, K.R. 2003. Flavor of cheddar cheese: A chemical and sensory perspective. *Compr. Rev. Food Sci.* 2: 139-162.
- Singh, R.P., Heldman, D.R. 1998. Introducción a la ingeniería de alimentos. Ed. Acirbia. Zaragoza, España.
- Skogerson, K., Wohlgemuth, G., Barupal, D.K., Fiehn, O. 2011. The volatile compound BinBase mass spectral database. *BMC Bioinformatics* 12: 321. <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/12/321>

- Soltani, F., Akashi, Y., Kashi, A., Zamani, Z., Mostofi, Y., Kenji Kato, K. 2010. Characterization of Iranian melon landraces of *Cucumis melo* L. Groups Flexuosus and Dudaim by analysis of morphological characters and random amplified polymorphic DNA. *Breed. Sci.* 60: 34-45.
- Song, J., Forney, C.F. 2007. Flavour volatile production and regulation in fruit. *Can. J. Plant Sci.* 88: 537-550.
- Stolle-Smits, T., Beekhuizen, J.G., Kok, M.T.C., Pijnenburg, M., Recourt, K., Jan Derksen, J., Voragen, A.G.J. 1999. Changes in cell wall polysaccharides of green bean pods during development. *Plant Physiol.* 121: 363-372.
- Tadmor, Y., Fridman, E., Gur, A., Larkov, O., Lastochkin, E., Ravid, U., Zamir, D., Lewinsohn, E. 2002. Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. *J. Agric. Food Chem.* 50: 2005-2009.
- Tang, M., Bie, Z., Wu, M., Yi, H., Feng, J. 2010. Changes in organic acids and acid metabolism enzymes in melon fruit during development. *Sci. Hortic.* 123: 360-365.
- Tang, M., Zhang, B-C., Xie, J-J., Bie, Z-L., Wu, M-Z., Yi, H-P., Feng, J-X. 2012. Sucrose and citric acid accumulations in melon genotypes with different sugar and acid contents *J. Food Agric. Environ.* 10: 225-231.
- The Good Scents Company Database. <http://www.thegoodscentscompany.com>
- Tieman, D.M., Zeigler, M., Schmelz, E.A., Taylor, M.G., Bliss, P., Kirst, M, Klee, H.J. 2006. Identification of loci affecting flavour volatile emissions in tomato fruits. *J. Exp. Bot.* 57:887-96
- Tijksens, L.M.M., Dos-Santos, N., Jowkar, M.M., Obando, J., Moreno, E., Schouten, R. E., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. 2009. Postharvest fruit firmness behaviour of near-isogenic lines of melon. *Postharvest Biol. Technol.* 51: 320-326.
- Trinh, T.T.T., Woon, W.Y., Yu, B., Curran, P., Liu, S.-Q. 2010. Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 31: 116-124.
- Tucker, G., Grierson, D. 1987. Fruit ripening. En: Davies, D. (Ed.). The biochemistry of plants. ch. 12, pp. 265-319.

- Tzitzikas, E.N., Monforte, A.J., Fatihi, A., Kypriotakis, Z., Iacovides, T.A., Ioannides, I.M., Kalaitzis, P. 2009. Genetic diversity and population structure of traditional greek and cypriot melon cultigens (*Cucumis melo* L.) based on simple sequence repeat variability. *Hortscience* 44: 1820-1824.
- USDA. United States Department of Agriculture. Nutrient Database 2010. <http://www.nutritiondata.com/facts/fruits-and-fruit-juices/1954/2>
- Valdés, H., Pizarro, M., Campos-Vargas, R., Rodrigo, I., Defilippi, B.G. 2009. Effect of ethylene inhibitors on quality attributes of apricot cv. Modesto and Patterson during storage. *Chilean J. Agric. Res.* 69: 134-144.
- Vallet, A., Lucas, P., Lonvaud-Funel, A., de Revel, G. 2008. Pathways that produce volatile sulphur compounds from methionine in *Oenococcus oeni*. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1833-1840.
- Vallone, S., Sivertsen, H., Anthon, G.E., Barrett, D.M., Mitcham, E.J., Ebeler, S.E., Zakharov, F. 2013. An integrated approach for flavour quality evaluation in muskmelon (*Cucumis melo* L. reticulatus group) during ripening. *Food Chem.* 139: 171-183.
- Van de Poel, B., Bulens, I., Markoula, A., Hertog, M.L.A.T.M., Dreesen, R., Wirtz, M., Vandoninck, S., Oppermann, Y., Keulemans, J., Hell, R., Waelkens, E., De Proft, M.P., Sauter, M., Nicolai, B.M., Geeraerd, A.H. 2012. Targeted systems biology profiling of tomato fruit reveals coordination of the yang cycle and a distinct regulation of ethylene biosynthesis during postclimacteric ripening. *Plant Physiol.* 160: 1498-1514 .
- Varlet, X., Fernández, X. 2010. Review. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation. *Food Sci. Tech. Intl.* 16: 463-503.
- Vegas, J., Garcia-Mas, J., Monforte, A.J. 2013. Interaction between QTLs induces an advance in ethylene biosynthesis during melon fruit ripening. *Theor. Appl. Genet.* 126: 153-44.

- Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Ziino, M., Lanza, C.M., Mazzaglia, A. 2010. Fast quantitative determination of aroma volatile constituents in melon fruits by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Meth.* 4: 141-149.
- Vicente, A.R., Saladié, M., Rose, J.K.C., Labavitch, J.M. 2007. The linkage between cell wall metabolism and fruit softening: looking to the future. *J. Sci. Food Agric.* 87: 1435-1448.
- Vicente, A.R., Manganaris, G.A., Sozzi, G.O., Crisosto, C.H. 2009. Nutritional quality of fruits and vegetables. En: Wojciech J. Florkowski, W.J., Shewfelt, R.L., Brueckner, B., Prussia, S.E (Eds.). *Postharvest Handling: A Systems Approach*. Elsevier Inc. Academic Press. 2nd Ed. ch. 5, pp. 57-106.
- Vijay, P., Pandey, R., Srivastava, G.C. 2012. The fading distinctions between classical patterns of ripening in climacteric and non-climacteric fruit and the ubiquity of ethylene-An overview. *J. Food Sci. Technol.* 49: 1-21.
- Villanueva, M.J., Tenorio, M.D., Esteban, M.A., Mendoza, M.C. 2004. Compositional changes during ripening of two cultivars of muskmelon fruits. *Food Chem.* 87: 179-185.
- Virtis 2008. *Lyophilization* 101. Gardiner, New York, EE.UU.
- Wakabayashi, K. 2000. Changes in cell wall polysaccharides during fruit ripening. *J. Plant Res.* 113: 231-237.
- Wakasa, Y., Kudoa, H., Ishikawa, R., Akada, S., Senda, M., Niizeki, M., Harada T. 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol. Technol.* 39: 193-198.
- Waldron, K.W., Parker, M.L., Smith, A.C. 2003. Plant cell walls and food quality. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safety* 2: 101-119.
- Wang, Y., Wyllie, S.G., Leach, D.N. 1996. Chemical changes during the development and ripening of the fruit of *Cucumis melo* (cv. makdimon). *J. Agric. Food Chem.* 44: 210-216.
- Ware, G.W., McCollum, J.P. 1980. *Producing vegetable crops*. Danville, Illinois: Interstate, EE.UU. p. 607.

- Wikipedia 2013. <http://en.wikipedia.org/wiki/Methanethiol>.
- Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y., Shewfelt, R.L. 1996. Key aroma compounds in melons. Their development and cultivar dependence. *ACS Symp. Ser.* 596: 248-257.
- Yahyaoui, F.E.L., Wongs-Aree, C., Latché, A., Hackett, R., Grierson, D., Pech, J.C. 2002. Molecular and biochemical characteristics of a gene encoding an alcohol acyl-transferase involved in the generation of aroma volatile esters during melon ripening. *Eur. J. Bot.* 269: 2359-2366.
- Yamamoto, M., Miki, T., Ishiki, Y., Fujinami, K., Yanagisawa, Y., Nakagawa, H., Ogura, N., Hirabayashi, T., Sato, T. 1995. The synthesis of ethylene in melon fruit during the early stage of ripening. *Plant Cell Physiol.* 36: 591-596.
- Yang, S.F., Hoffman, N.E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 35: 155-189.
- Yapo, B.M., Koffi, K.L. 2008. The polysaccharide composition of yellow passion fruit rind cell wall: chemical and macromolecular features of extracted pectins and hemicellulosic polysaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 88: 2125-2133.
- Zhang, M.F., Li, Z.L. 2005. A comparison of sugar-accumulating patterns and relative compositions in developing fruits of two oriental melon varieties as determined by HPLC. *Food Chem.* 90: 785-790.
- Zheng, X.Y., Wolff, D.W. 2000. Ethylene production, shelf-life and evidence of RFLP polymorphisms linked to ethylene genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 613-624.
- Zheng, X.Y., Wolff, D.W., Crosby, K.M. 2002. Genetics of ethylene biosynthesis and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) of ACC oxidase and synthase genes in melon (*Cucumis melo* L.). *Theor. Appl. Genet.* 5: 397-403.
- Zhu, L-Q., Zhou, J., Zhu, S.-H. 2010. Effect of a combination of nitric oxide treatment and intermittent warming on prevention of chilling injury of 'Feicheng' peach fruit during storage. *Food Chem.* 121: 165-170.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Rambla, J.L., Cabeza, A., Medina, J.J., Sánchez-Sevilla, J.F., Valpuesta, V., Botella, M.A., Granell, A., Amaya, I. 2012. Genetic analysis of strawberry fruit aroma and identification of o-methyltransferase faOMT as the locus controlling natural variation in mesifurane content. *Plant Physiol.* 159: 851-870.

SOPORTE FINANCIERO PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA QUE DERIVA ESTA TESIS.

El soporte financiero principal se basa en proyectos financiados con fondos nacionales y regionales cuyo investigador principal es el profesor Juan Pablo Fernández Trujillo en la Universidad Politécnica de Cartagena. En resumen son los siguientes:

- **Evaluación de atributos de calidad importantes desde el punto de vista tecnológico y para el consumidor en líneas isogénicas de melón.**

Duración: 1 Diciembre 2003 - 30 Noviembre 2007.

Entidad financiadora: Ministerio de Educación y Ciencia (Ministerio de Ciencia y Tecnología (MEC, MCYT) AGL2003-09175-C02-02. Proyecto coordinado.

- **Identificación de QTLs implicados en parámetros de calidad pre y poscosecha de fruto usando un conjunto de líneas de introgresión de melón.**

Duración: 1 Enero 2005 - 31 Diciembre 2006.

Entidad financiadora: Fundación Séneca de la Región de Murcia. Centro de Coordinación de la Investigación. 00620/PI/04.

- **Identificación de poligenes implicados en el perfil aromático y características relacionadas con preferencias de consumo en melón usando una colección de líneas casi isogénicas.**

Duración: 6 Enero 2007 - 5 Enero 2011. Proyecto BioCARM.

Entidad financiadora: Consejería de Educación y Cultura de la CARM. Proyecto BIO-AGR06/02-0011.

- **Caracterización detallada de QTLs responsables del carácter climatérico y sus efectos sobre la calidad global del fruto de melón.**

Duración: 1 Enero 2007 - 31 Diciembre 2009

Entidad: Fundación Séneca de la Región de Murcia. Agencia Regional de Investigación de la C.A. de Murcia. 05676/PI/07.

- **Análisis del efecto de QTLs que inducen cambios en la textura de la pulpa y la calidad global del fruto de melón.**

Duración: 1 Enero 2010 - 31 Diciembre 2014.

Entidad financiadora: Fundación Séneca de la Región de Murcia. Centro de Coordinación de la Investigación. 11784/PI/09.

- **Calidad aromática del melón y su relación con precursores y el comportamiento fisiológico del fruto.**

Duración: 1 Enero 2011 - 31 Diciembre 2013.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN). AGL2010-20858.

Anexo

Capítulo III. *Diferencias aromáticas entre melones climatéricos de dos tipos y no climatéricos del tipo ‘Piel de Sapo’.*

Diferencias aromáticas entre melones climatéricos de dos tipos y melones no climatéricos del tipo “Piel de Sapo”

Noelia Dos-Santos¹, María del Carmen Bueso², Antonio José Monforte³ y Juan Pablo Fernández-Trujillo^{1,*}
Equipo Multidisciplinar de Investigación en Calidad Postcosecha Orientada a Mejora Genética y Biotecnología

¹ Universidad Politécnica de Cartagena (UPCT). Dpto. de Ingeniería de Alimentos y del Equipamiento Agrícola. ETSIA e Instituto de Biotecnología Vegetal. Paseo Alfonso XIII 48, 30203 Cartagena (Murcia)
*Teléfono: 968 325436. E-mail: juanp.fdez@upct.es

² UPCT. Dpto. de Matemática Aplicada y Estadística. ETSII. Doctor Fleming s/n, 30202 Cartagena (Murcia)

³ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). CSIC/UPV
Ciudad Politécnica de la Innovación - Edificio 8E Ingeniero Fausto Elio s/n, 46022 Valencia

Resumen. En diferentes cultivares de melón aromáticos y climatéricos o no climatéricos se han detectado diferencias en producción de etileno durante la maduración postcosecha. Los volátiles del parental “Piel de Sapo” (PS) y de una variedad comercial (“Nicolás”) sirvieron de referencia como no climatéricos mientras que la línea casi isogénica 6M1 y la variedad “Védrantais” fueron considerados como los aromáticos y climatéricos. El carácter climatérico se caracterizó por el contenido en ésteres (acéticos y no acéticos) y compuestos derivados del azufre, con mayor contenido en ésteres no acéticos (metil 2-metilbutanoato) en “Védrantais”. Los frutos de melones no climatéricos se diferenciaron por un alto contenido en aldehídos como el 2-metilpropanal (mayor contenido en “Nicolás”), terpenos, alcoholes y cetonas, como la 2-butanona (mayor contenido en PS). Los resultados analizados mostraron que existe una influencia genética de la variedad en biosíntesis y rutas metabólicas de aromas volátiles, especialmente en ésteres no acetato en variedades climatéricas con muy alta producción de etileno.

1. Introducción

El comportamiento fisiológico de los frutos de melón según su carácter climatérico está determinado genéticamente, aunque el control genético de la transición climatérica todavía no está completamente determinado [1].

El aroma de la fruta es uno de los parámetros que más influyen en las preferencias del consumidor y es el resultado de una compleja mezcla con una amplia gama de compuestos con diferente grado de volatilidad. Una importante contribución al aroma característico de la fruta y a la percepción de su calidad general depende de los ésteres y en cierta medida de los compuestos azufrados [2, 3, 4]. En melones climatéricos, el aroma debido a los volátiles es un factor esencial de calidad vinculado al proceso de maduración y está controlado genéticamente [5].

Existe un interés creciente por conocer marcadores moleculares asociados a atributos de calidad del melón, como el aroma, e identificar *Quantitative Trait Loci* (QTL) asociados al climaterio y la producción de etileno que están directamente relacionados con la vida comercial del fruto [6, 7]. En trabajos previos con líneas casi isogénicas (NILs) de melón [7, 8] hemos determinado que la presencia de un QTL en el grupo de ligamiento III produce frutos aromáticos y con pulpa de un aroma retronasal diferenciado del tipo “Piel de Sapo” (PS) no climatérico. Sin embargo, dentro de los melones

climatéricos verificamos que hay variabilidad en aromas [7]. Igualmente existe interés por verificar si existen algunos aromas diferentes entre tipos no climatéricos “Piel de Sapo” con fines de mejora genética.

La coexistencia de variedades de melón con maduración climatérica y no climatérica dentro de la especie, hacen que sea un sistema adecuado para estudiar el control genético de la maduración climatérica [6]. En [7] solamente utilizamos un perfil de 29 aromas volátiles comunes para diferenciar entre NILs climatéricas y no climatéricas, “Védrantais” y “Nicolás”, además de otras líneas. En el presente trabajo evaluamos todos los aromas detectados con microextracción en fase sólida (SPME) para verificar mayores diferencias y rutas metabólicas asociadas.

2. Material y Métodos

Los frutos procedieron de una colección de líneas casi-isogénicas ó NILs de melón ampliamente descrita [6, 9]. El material vegetal consistió en dos tipos no climatéricos: un parental tipo español “Piel de Sapo” (*C. melo* var. *inodorus* Naud cv. T111) y un melón híbrido var. Nicolás (Syngenta Seeds). Respecto a los tipos climatéricos fueron: *C. melo* var. *cantalupensis* Naud, cv. Védrantais y la línea casi isogénica 6M1, con dos introgresiones (grupos de ligamiento III y VI) del cultivar coreano *Shongwan Charmi* PI 161375 (SC) en el fondo genético del tipo PS [6]. Los frutos se cultivaron en Torre Pacheco (Murcia) según manejo de cultivo, prácticas de

cosecha e índices de recolección previamente descritos [10, 11]. Se recolectaron frutos de n=7 réplicas (3 plantas/réplica), salvo n=21 para PS siguiendo un diseño experimental previamente descrito [9].

La tasa respiratoria y la producción de etileno se determinaron tras la cosecha en al menos cinco frutos individuales de diferentes réplicas según [11]. Los volátiles de zumo de melón se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) por SPME según metodología adaptada de [7]. Se aplicaron diferentes técnicas estadísticas de análisis multivariante (PCA, RF o PLS-DA, entre otras), siguiendo la metodología descrita en [7] y [12], que permitieron determinar el poder discriminante de los aromas volátiles entre las cuatro líneas en estudio. Para ello, se utilizó el entorno de programación R v2.11.0.

3. Resultados y Discusión

Según los niveles de producción de etileno y de la tasa respiratoria, datos no mostrados o publicados en [6, 11], las líneas se clasificaron en: No climatérica (PS y “Nicolás”), climatérica leve (6M1) y climatérica moderada (“Vedrantais”).

En el análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para grupos de compuestos volátiles, la primera componente (60% de varianza total explicada) permitió discriminar las líneas climatéricas (por su contenido en ésteres acéticos y derivados azufrados) de las no climatéricas (mayor contenido en cetona, alcanos, alcoholes, terpenos y otros). La segunda componente extraída en PLS-DA (7.1% de varianza total) sirvió para discriminar dentro de las líneas climatéricas y no climatéricas, con más poder discriminatorio dentro de las climatéricas, con 6M1 más asociada a derivados azufrados y “Vedrantais” a ésteres no acetato. “Nicolás” presentó más niveles de aldehídos que PS (más asociado a alcoholes) (Fig. 1). La mayoría de compuestos identificados en melón han sido alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, y compuestos azufrados, que dependen de la variedad y del comportamiento fisiológico. Los frutos climatéricos de melón de mayor intensidad aromática suelen presentar menor vida comercial que los no climatéricos. El contenido de compuestos volátiles responsables del “aroma de melón” es variado y cultivar-dependiente, incluso teniendo similar comportamiento fisiológico [2, 5, 7, 13]. Los ésteres han sido establecidos como típicos compuestos volátiles en NILs climatéricas de melón mientras que los aldehídos son característicos de NILs no climatéricas [7]. No es descartable una interacción entre genotipo x ambiente variable con las campañas.

Respecto a aromas individuales, las NILs climatéricas mostraron diferencias entre sí. La NIL 6M1 (climaterio leve) destacó por su contenido en 9 compuestos, ésteres acetato (2-feniletil acetato, 3-acetilpropil acetato y 2-metilbutilacetato)

principalmente, mientras 8 compuestos, sobre todo ésteres no acetato (metil 2-metilbutanoato, butil propanoato y 2-metilpropil propanoato), discriminaron “Vedrantais” (climaterio moderado), de 6M1 (datos no mostrados).

Ésteres de cadena lineal, junto con ésteres de cadena ramificada derivados de la isoleucina fueron volátiles mayoritarios en las líneas climatéricas de acuerdo con [3]. Estos ésteres, junto a otros, son cuantitativamente los compuestos más importantes y contribuyen de forma importante al aroma único de frutas maduras de melón climatérico [14]. El carácter climatérico estuvo fuertemente asociado a la producción de ésteres y compuestos derivados azufrados, lo que revela su dependencia al menos parcial de la acción del etileno. La catálisis de la enzima alcohol acetil transferasa (a partir de alcoholes procedentes de aldehídos) y la producción de derivados azufrados a partir de metionina explicarían en parte este comportamiento [4, 15]. Las dos líneas no climatéricas tuvieron un comportamiento similar en contenido en volátiles, con alto contenido en alcoholes (ej. 3,5-dimetilciclohexan-1-ol). El control PS destacó por su mayor contenido en cetonas (ej. 2-butanona, procedente de butano-2,3-diona y acetona; [16]) y el 2-metilpropanal discriminó parcialmente a “Nicolás” de PS (datos no mostrados). Este último es el precursor de los 2-metilpropil ésteres procedentes de la valina [17].

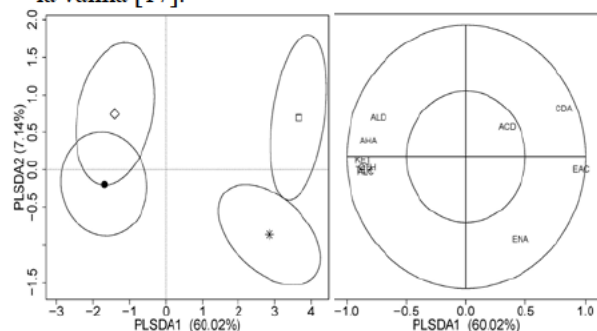


Figura 1. Centroides de la NIL 6M1 (□), los cultivares “Nicolás” (◇) y “Vedrantais” (*) y el control PS (●) en función de las dos primeras componentes del análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para grupos de compuestos volátiles (izq.). Correlaciones entre los grupos de compuestos y las dos primeras componentes. Abrev.: Alcoholes (ALC), aldehídos (ALD), cetonas (KET), terpenos (TER), ésteres acéticos (EAC), ésteres no acéticos (ENA), compuestos derivados del azufre (CDA), ácidos (ACD), alcanos (AHA) y otros (OTH) (dcha.).

4. Conclusiones

Parece existir alguna diferencia genética asociada a un mayor grado de climaterio y de ésteres no acetato en “Vedrantais” respecto a la línea casi isogénica 6M1. Aldehídos y cetonas estuvieron asociados al comportamiento no climatérico y discriminaron ligeramente entre las líneas PS y “Nicolás”, lo que soporta también una componente genética que podría integrarse a la mejora del aroma de los melones tipo “Piel de Sapo”. La introgresión que produjo climaterio leve en 6M1 está muy asociada a QTL relacionados con la biosíntesis de ésteres.

Agradecimientos

Proyec. finan.: AGL2010-20858 y AGL2003-09175-C02-02 (MICINN y MEC, respectivamente; FEDER), BIO-AGR06/02-0011 (CARM) y 11784/PI/09 (Fund. Séneca, Región de Murcia). NDS agradece la beca predoctoral FPU-MEC AP2006-01565. Agradecemos a Semillas Fitó las semillas de PS y al IRTA las de NILs, a JO, JAM, CM, MJF, MAQ y al SAIT-UPCT la asistencia técnica.

Referencias

- [1] Vegas, J., Rios, W., Sanseverino, A.J., Monforte, A.J., García-Mas, J. (2012). "Eth3.5 and eth6.3 control climacteric fruit ripening in the near isogenic line SC3-5-1". X Eucarpia International Meeting on Cucurbitaceae 2012. En prensa.
- [2] Verzera, A., Dima, G., Tripodi, G., Ziino, M., Lanza, C.M., Mazzaglia, A. (2010). "Fast quantitative determination of aroma volatile constituents in melon fruits by headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry". *Food Anal. Methods* 4: 141-149.
- [3] Bauchot, D.A., Mottram, D.S., Dodson, A.T., John, P. (1998). "Effect of aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase antisense gene on the formation of volatile esters in cantaloupe Charentais melon (cv. Védrentais)". *J. Agric. Food Chem.* 46: 4787-4792.
- [4] Lucchetta, L., Manrique, D., El-sharkawy, I., Flores, F.B., Sanchez-Bel, P., Zouine, M., Ginies, C., Bouzayen, M., Rombaldi, C., Pech, J.C., Latché, A. (2007). "Biochemical and catalytic properties of three recombinant alcohol acyltransferases of melon. Sulfur-containing ester formation, regulatory role of CoA-SH in activity, and sequence elements conferring substrate preference". *J. Agric. Food Chem.* 55: 5213-5220.
- [5] Núñez-Palenius, H.G., Gómez-Lim, M., Ochoa-Alejo, N., Grumet, R., Lester, G., Cantliffe, D.J. (2008). "Melon fruits: genetic diversity, physiology, and biotechnology features". *Crit. Rev. Biotechnol.* 28: 13-55.
- [6] Moreno, E., Obando, J., Dos-Santos, N., Fernández-Trujillo, J.P., Monforte, A.J., García-Mas, J. (2008). "Candidate genes and QTLs for fruit ripening and softening in melon". *Theor. Appl. Genet.* 116: 589-602.
- [7] Obando-Ulloa, J., Moreno, E., García-Mas, J., Nicolai, B., Lammertyn, J., Monforte, A. J., Fernández-Trujillo, J. P. (2008). "Climacteric or non-climacteric behavior in melon fruit. 1. Aroma volatiles". *Postharvest Biol. Technol.* 49: 27-37.
- [8] Fernández-Trujillo, J.P., Bueso, M.C., Hernández, M.S. (2012). "Quality oriented breeding using sensory attributes in melon: the case of climacteric and non-climacteric near-isogenic lines obtained from non-climacteric parents". *Acta Hort.* 934: 975-984.
- [9] Obando, J., Fernández-Trujillo, J.P., Martínez, J.A., Alarcón, A.L., Eduardo, I., Arús, P., Monforte, A.J. (2008). "Identification of quantitative trait loci of melon fruit quality traits". *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 133: 139-151.
- [10] Obando-Ulloa, J.M., Eduardo, I., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. (2009). "Identification of QTLs related to sugar and organic acid composition in melon using near-isogenic lines". *Sci. Hort.* 121: 425-433.
- [11] Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Martínez, J.A., Moreno, E., García-Mas, J., Monforte, A.J. (2008). "Climacteric and non-climacteric behavior in melon fruit 2. Linking climacteric pattern and main postharvest disorders and decay in a set of near-isogenic lines". *Postharvest Biol. Technol.* 50: 125-134.
- [12] Fernández-Trujillo, J.P., Obando-Ulloa, J.M., Monforte, A.J., Sanmartín, P., Kessler, M., Bueso, M.C. (2009). "Métodos estadísticos multivariantes aplicables a estudios de calidad postcosecha del fruto de melón". *Actas del Quinto Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios*. Alsina, I., Martín de la Hinojosa, M.I., Hooghuis, H. (Coords.), Madrid, Min. Med. Amb. Medio Rural y Marino, pp. 13-21.
- [13] Obando-Ulloa, J.M., Ruiz, J., Monforte, A.J., Fernández-Trujillo, J.P. (2010). "Aroma profile of a collection of near-isogenic lines of melon". *Food Chem.* 118: 815-822.
- [14] Flores, F.B., Manrique, D., El-Sharkawy, I., Latché, A., Pech, J.C. (2005). "Characterization of genes involved in the formation of aroma volatiles in 'Charentais' melon fruit". *Acta Hort.* 682: 673-679.
- [15] Varlet, V., Fernández, X. (2010). "Review. Sulfur-containing volatile compounds in seafood: Occurrence, odorant properties and mechanisms of formation". *Food Sci. Technol. Intl.* 16: 463-503.
- [16] Min, D.B. (2012). "Flavor chemistry". OST 820 course. Ohio State Univ. <http://www.slideserve.com/flower/flavorchemistry-820>.
- [17] Wyllie, S.G., Leach, D.N., Wang, Y., Shewfelt, R.L. (1995). "Key aroma compounds in melons". En: Roussef, R.L. and Leahy, M.M. (Eds.), *Fruit flavors*. ACS Symp. Ser. 596. Amer. Chem. Soc., Washington D.C., pp. 248-257.